

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

(21) **PI0617456-6 A2**

(22) Data de Depósito: 17/10/2006
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/00 2006.01
C07K 14/18 2006.01

(54) Título: **VACINA À BASE DE VETOR LENTIVIRAL**

(30) Prioridade Unionista: 17/10/2005 US 11/250,616

(73) Titular(es): Institut Pasteur

(72) Inventor(es): Philippe Despres, Pierre Charneau

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006003931 de 17/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/052165de 10/05/2007

(57) Resumo: VACINA À BASE DE VETOR LENTIVIRAL presente invenção refere-se a métodos para provocar respostas humorais, métodos de imunização e métodos de vacinação usando vetor lentiviral. Além disso, apresentam-se composições imunogênicas e vacinas para vírus do Nilo Ocidental.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**VACINA À BASE DE VETOR LENTIVIRAL**".

Descrição da Invenção

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um vetor lentiviral, a métodos de transferência de genes, imunização e vacinação usando o vetor lentiviral, a processos para a produção de polipeptídios recombinantes, a anticorpos gerados contra esses polipeptídios e ao uso dessas moléculas em métodos diagnósticos, kits, composições imunogênicas, vacinas e terapia antiviral.

Antecedentes da Invenção

Nos últimos anos, vetores de transferência de genes lentivirais ganharam um considerável interesse na comunidade de terapia genética. Essa reputação sem igual é devida à sua capacidade de transferir de maneira eficiente e estável genes terapêuticos ou repórteres a uma grande variedade de células e tecidos de importância chave para intervenção terapêutica, como células-tronco hematopoiéticas, cérebro, fígado e retina (vide [1-4], entre outros). Os vetores lentivirais conseguem uma elevada eficiência de transdução, independentemente do status proliferativo das células alvo, superando, dessa forma, uma das principais limitações dos vetores retrovirais derivados de oncovírus, em que a transdução se restringe a células em divisão.

Essa vantagem se reflete em inúmeros testes pré-clínicos bem-sucedidos em vários modelos animais de doenças humanas (vide [5-11], entre outros), e se traduzirá indubitavelmente em sua exploração em um número crescente de ensaios clínicos.

Mais recentemente, os vetores lentivirais também se mostraram vetores de vacinação promissores. A maioria dos estudos até agora focalizou a indução de respostas imunes celulares no campo de imunoterapia antitumoral [12-18], alguns poucos também focalizaram a indução de imunidade celular protetora contra vírus [19-21].

Sua capacidade de transduzir células dendríticas (DCs) não em divisão com alta eficiência, ex vivo [12, 14, 15, 19], assim como in vivo [13,

18, 22], responde por sua capacidade de gerar fortes respostas CTL.

De fato, relatos usando vetores lentivirais para estimular imunidade antitumoral mostram resultados muito promissores. DCs humanas transduzidas por vetores lentivirais que expressem antígenos tumorais estimulam respostas CTL específicas *in vitro* [12, 14, 15, 18]. Em camundongos, a injeção de partículas de vetores lentivirais ou DCs transduzidas com vetor lentiviral induzem respostas imunes celulares antitumorais fortes e específicas [13, 15, 18] e conferem proteção contra desafios tumorais [12, 17]. Essas respostas são mais potentes do que as obtidas pela imunização clássica com peptídeo mais adjuvante [13] ou mesmo células apresentadoras de antígeno (APCs) pulsadas com peptídeo, quer ensaiadas *ex vivo* [20], quer *in vivo* [16, 21]. A vantagem observada poderia ser devida à apresentação contínua do antígeno em APCs transduzidas com vetor, em contraste com a apresentação de antígeno transitória que se segue ao pulso com peptídeo de APCs [16, 20].

Até agora, pouco se sabe da capacidade de vetores lentivirais de estimular uma imunidade protetora à base de anticorpos. Todavia, sua alta eficiência de transdução também poderia lhes conferir uma forte capacidade de induzir imunidade humoral. Além disso, seu tropismo aparentemente preferencial para DCs, quando injetado *in vivo* [13, 18, 22], poderia aumentar ainda mais sua capacidade de gerar uma imunidade protetora baseada em anticorpo, pois DCs são estimulantes poderosos de células T CD4, que são necessárias para o desenvolvimento correto de uma resposta imune à base de células B. Além disso, em um cenário de vacinação, a expressão estável do antígeno de células transduzidas poderia evitar a necessidade de várias injeções.

De fato, é amplamente aceito que a resposta imune humoral é o componente essencial da imunidade protetora contra o Vírus do Nilo Ocidental (WNV) [23 – 25]. A E-glicoproteína de envoltório de WNV, que possui epítopos neutralizadores [26], gera respostas imunes protetoras, quando injetada como um antígeno recombinante [27] ou expressada por DNA nu [28] ou um vetor de sarampo replicativo [29]. O fato de a transferência passiva de

anticorpos neutralizadores contra a forma solúvel da E glicoproteína de invólucro (sE) de WNV cepa IS-98-ST1 proteger camundongos contra encefalite por WNV também demonstra que a resposta humoral é suficiente para a proteção contra desafio com WNV [29].

O WNV é um flavivírus transportado por mosquitos no sorocomplexo de encefalite japonesa da família Flaviviridae. É transmitido em ciclos naturais entre aves e mosquitos, mas pode infectar muitas espécies de mamíferos [30]. WNV zoonótico recentemente se tornou uma grande preocupação de saúde na América do Norte, no Oriente Médio e na Europa devido à emergência de uma cepa mais virulenta em Israel em 1998 e, então, em Nova Iorque em 1999 (Isr98/NY99). Manifestações clínicas graves da infecção por WNV essencialmente envolvem o sistema nervoso central e podem causar mortalidade significativa em seres humanos e em uma grande gama de espécies de animais, particularmente cavalos e aves (para uma revisão, vide [30]). Como consequência, há uma demanda urgente pelo desenvolvimento de uma vacina eficiente que possa conferir uma imunidade rápida, forte e de longa duração.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção ajuda a atender a essas necessidades na técnica. Esta invenção se refere ao potencial de vetores lentivirais de gerar uma resposta imune humoral. Investigou-se se a imunização com uma vacina de base lentiviral poderia proteger contra a infecção pelo Vírus do Nilo Ocidental (WNV). Descobriu-se, surpreendentemente, que vetores lentivirais podem gerar imunidade protetora com base em anticorpos.

Na presente invenção, avaliou-se o potencial de uma vacina à base de vetor lentiviral de gerar imunidade humoral contra o Vírus do Nilo Ocidental (WNV), um flavivírus transportado por mosquitos que causa encefalite em seres humanos, aves e cavalos. Notavelmente, uma única imunização com uma dose diminuta de TRIP/sE_{WNV}, um vetor lentiviral que expressa a forma solúvel secretada da E-glicoproteína de invólucro (sE_{WNV}) da cepa IS-98-ST1 altamente virulenta de WNV, induziu uma resposta humoral específica e proteção contra infecção por WNV em um modelo de camundongo

da encefalite por WNV. Essa única imunização gerou uma imunidade humoral de longa duração, protetora e esterilizante apenas uma semana após o primeiro contato. Esses resultados demonstram a aplicabilidade de vetores lentivirais como vacinas não replicantes eficientes contra patógenos para os quais uma resposta humoral neutralizadora seja ativamente requerida para imunidade protetora. O vetor lentiviral TRIP/sE_{WNV} parece ser uma ferramenta promissora para vacinação veterinária contra WNV zoonótico.

Assim, esta invenção apresenta um método de produção de anticorpos in vivo, compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal, em que o lentivírus compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera uma resposta humoral no animal. A invenção engloba um vetor lentiviral que induz imunidade protetora a um animal necessitado, incluindo, por exemplo, imunidade protetora de longa duração e imunidade esterilizante. Em uma modalidade, o animal necessitado é selecionado de seres humanos, cavalos, aves, galinhas, porcos, gado, incluindo bovinos, ovinos e caprinos, roedores, incluindo hamsters, ratos e camundongos, animais de estimação e répteis.

Esta invenção também apresenta um método de produção de anticorpos in vivo, compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal, em que o lentivírus compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera uma resposta humoral no animal, em que o vetor lentiviral induz imunidade protetora contra um microorganismo infeccioso. Em uma modalidade, o microorganismo infeccioso é o Vírus do Nilo Ocidental. Em outra modalidade, o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico que codifica um peptídeo ou polipeptídeo portando pelo menos um epítipo B. O polipeptídeo portando pelo menos um epítipo B pode ser, por exemplo, uma proteína de membrana de microorganismo ou seu fragmento e, em particular, a E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental ou seu fragmento. O vetor lentiviral pode compreender uma E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do Vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, por exemplo, uma E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos

1 – 441 da E-glicoproteína de envólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1. Em outra modalidade, o ácido nucléico heterólogo codifica uma variante da E-glicoproteína de envólucro do Vírus do Nilo Ocidental. A invenção engloba um ácido nucléico heterólogo variante que se hibridiza sob condições de hibridização rigorosa, que serão descritas adiante, a um ácido nucléico do Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1, que codifica a E-glicoproteína de envólucro.

A invenção também apresenta um método de vacinação de um animal contra infecção pelo Vírus do Nilo Ocidental, compreendendo a administração a um animal necessitado, uma ou mais vezes, de um vetor lentiviral compreendendo um ácido nucléico que codifica um peptídeo portando pelo menos um epítipo B. O peptídeo portando pelo menos um epítipo B pode ser, por exemplo, uma proteína de membrana de microorganismo ou seu fragmento e, em particular, E-glicoproteína de envólucro do Vírus do Nilo Ocidental ou seu fragmento, com um veículo e/ou adjuvante fisiológico aceitável. Vias de administração adequadas *in vivo* incluem, por exemplo, uma via intraperitoneal, via intravenosa, via intramuscular, via oral, via mucosa, via sublingual, via intranasal, via subcutânea ou via intradérmica. Vias adequadas *ex vivo* incluem a administração de células autólogas transduzidas com o vetor lentiviral [isto é, Células Apresentadoras de Antígeno (APC) como células dendríticas (DC) ou células B]. Em uma modalidade, o ácido nucléico heterólogo codifica um peptídeo ou polipeptídeo portando pelo menos um epítipo B. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo codifica uma proteína de membrana ou seu fragmento. Em outra modalidade preferida, o ácido nucléico heterólogo codifica E glicoproteína truncada na terminação carboxila do Vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana. Em outra, a E glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de envólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1. Uma modalidade preferida desta invenção engloba a administração do vetor lentiviral em um número limitado de doses como, por exemplo, uma única dose ou duas ou três doses. Em uma modalidade, essa dose compreende, por exemplo, partículas de vetor equivalen-

tes a 0,5 ng a 5.000 ng de antígeno p24. Em camundongos, a dose preferida pode variar de 0,5 ng a 50 ng, ao passo que, em cavalos, a dose preferida pode variar de 50 ng a 500 ng. A invenção engloba o tratamento de animais como, por exemplo, seres humanos, cavalos, aves, galinhas, porcos, gado, incluindo bovinos, ovinos e caprinos, roedores, incluindo hamsters, ratos e camundongos, animais de estimação e répteis.

A invenção também apresenta um método para a vacinação de um animal contra infecção por microorganismo, compreendendo a administração a um animal necessitado, uma ou mais vezes, de um vetor lentiviral compreendendo um ácido nucléico heterólogo que codifique uma proteína de membrana imunogênica, ou seu fragmento, desse microorganismo. Conforme aqui usado, o termo microorganismo engloba vírus, bactérias e parasitas.

Em uma modalidade preferida, a invenção apresenta um método para a vacinação de um animal necessitado contra uma infecção por vírus, como uma infecção por falvívirus, e, em particular, um método para a vacinação de um animal necessitado contra infecção pelo Vírus do Nilo Ocidental, por administração de um vetor lentiviral compreendendo uma variante da E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento, com um veículo e/ou adjuvante fisiológico aceitável. A invenção engloba um método de vacinação em que o ácido nucléico heterólogo se hibridiza, sob condições de hibridização rigorosa, a um ácido nucléico de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1, que codifica E-glicoproteína de invólucro. Em uma modalidade, o vetor lentiviral é administrado uma vez, por exemplo, em uma dose de partículas de vetor equivalentes a 0,5 ng a 5.000 ng de antígeno p24. O animal necessitado pode incluir seres humanos, cavalos, aves, galinhas, porcos, gado, incluindo bovinos, ovinos e caprinos, roedores, incluindo hamsters, ratos e camundongos, animais de estimação, como cães e gatos, e répteis.

A invenção também apresenta uma composição imunogênica compreendendo um vetor lentiviral, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno em uma quantidade sufi-

ciente para induzir uma resposta imunogênica ou protetora in vivo e um veículo farmacologicamente aceitável para ele. A invenção engloba uma composição imunogênica, em que o ácido nucléico heterólogo codifica um peptídeo portando pelo menos um epítipo B. Um peptídeo portando pelo menos um epítipo B pode ser, por exemplo, uma proteína de membrana de microorganismo, ou seu fragmento, e, em particular, E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento, ou uma E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do Vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana. Em uma modalidade, a E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreende os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de invólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.

A invenção também apresenta uma composição imunogênica compreendendo um vetor lentiviral, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno em uma quantidade suficiente para induzir uma resposta imunogênica ou protetora in vivo, e um veículo farmacologicamente aceitável para ele, e em que o ácido nucléico heterólogo codifica uma variante da E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental. Em um exemplo, o ácido nucléico heterólogo se hibridiza, sob condições de hibridização rigorosa, a um ácido nucléico de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1, que codifica E-glicoproteína de invólucro.

A invenção engloba um vetor lentiviral que dirige a expressão de um ácido nucléico heterólogo, em que o vetor compreende o promotor precoce imediato do citomegalovírus, e em que o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento. O ácido nucléico heterólogo pode codificar, por exemplo, E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do Vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana. Em uma modalidade, a E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreende os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de invólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1. A invenção também apresenta uma célula hospedeira substancialmente purificada transfectada ou transduzida com esse vetor lentiviral, e um método para a produção do polipeptídeo E-glicoproteína de invólucro do Vírus

do Nilo Ocidental, ou seu fragmento, compreendendo o cultivo de uma célula hospedeira transfectada ou transduzida com esse vetor lentiviral, sob condições que promovam a expressão, e recuperação do polipeptídeo da célula hospedeira ou do meio de cultura.

A invenção também apresenta um vetor lentiviral que dirige a expressão de um ácido nucléico heterólogo, em que o vetor compreende o promotor precoce imediato do citomegalovírus, e em que o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental. Em uma modalidade, o ácido nucléico heterólogo se hibridiza, sob condições de hibridização rigorosa, a um ácido nucléico de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1, que codifica E-glicoproteína de invólucro. A invenção engloba uma célula hospedeira substancialmente purificada transfectada ou transduzida com esse vetor lentiviral, e um método para a produção de uma variante de E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, compreendendo o cultivo de uma célula hospedeira transfectada ou transduzida com esse vetor lentiviral, sob condições que promovam a expressão, e recuperação do polipeptídeo da célula hospedeira ou do meio de cultura.

A invenção também apresenta um vetor lentiviral que dirige a expressão de um ácido nucléico heterólogo, em que o vetor compreende o promotor precoce imediato do citomegalovírus, e em que o ácido nucléico heterólogo compreende proteína fluorescente verde. A invenção também engloba uma célula hospedeira substancialmente purificada transfectada ou transduzida com esse vetor lentiviral.

A invenção engloba um método de vacinação contra um agente patogênico, compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal necessitado, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera anticorpos contra o agente patogênico. A invenção engloba, por exemplo, um método de vacinação em que a administração do vetor lentiviral gera imunidade humoral de longa duração. A invenção também engloba, por exemplo, um método de vacinação em que a administração do vetor lentiviral gera anticorpos neutralizadores contra o agente patogênico. O animal necessitado pode in-

cluír, por exemplo, seres humanos, cavalos, aves, galinhas, porcos, gado, incluindo bovinos, ovinos e caprinos, roedores, incluindo hamsters, ratos e camundongos, animais de estimação, como cães e gatos, e répteis. Em uma modalidade, o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico que codifica E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento, e o agente patogênico é o Vírus do Nilo Ocidental. Em outra modalidade, a E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental não possui uma região de ancoragem transmembrana. Em outra, a administração do vetor lentiviral compreende pelo menos uma dose de partículas de vetor equivalente a 0,5 ng a 5.000 ng de antígeno p24.

A invenção também apresenta um método para distribuir DNA para a produção de anticorpos in vivo, compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera uma resposta humoral no animal. A invenção engloba um vetor lentiviral que induz imunidade humoral protetora em um animal necessitado. Em uma modalidade, o animal necessitado é selecionado de seres humanos, cavalos, aves, galinhas, porcos, gado, incluindo bovinos, ovinos e caprinos, roedores, incluindo hamsters, ratos e camundongos, animais de estimação e répteis.

Esta invenção também apresenta um método para distribuir DNA para a produção de anticorpos in vivo, compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera uma resposta humoral no animal, em que o vetor lentiviral induz imunidade protetora contra o Vírus do Nilo Ocidental. Em uma modalidade, o vetor lentiviral pode compreender um ácido nucléico que codifica uma E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento. O vetor lentiviral pode compreender um ácido nucléico que codifica E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do Vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, por exemplo, uma E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-

glicoproteína de envólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1. Em outra modalidade, o ácido nucléico heterólogo codifica uma variante da E-glicoproteína de envólucro do Vírus do Nilo Ocidental. A invenção engloba um ácido nucléico heterólogo variante que se hibridiza, sob condições de hibridização rigorosa, a um ácido nucléico do Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1 que codifica a E-glicoproteína de envólucro.

A invenção também engloba um método compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera uma resposta humoral no animal. A invenção engloba um vetor lentiviral que induz imunidade humoral protetora em um animal necessitado. Em uma modalidade, o animal necessitado é selecionado de seres humanos, cavalos, aves, galinhas, porcos, gado, incluindo bovinos, ovinos e caprinos, roedores, incluindo hamsters, ratos e camundongos, animais de estimação e répteis.

A invenção também apresenta um método compreendendo a administração de um vetor lentiviral a um animal, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, em que o antígeno gera uma resposta humoral no animal, e em que o antígeno expressado no animal depois de sua transdução com o vetor lentiviral induz imunidade protetora contra um microorganismo infeccioso como, por exemplo, Vírus do Nilo Ocidental. Em uma modalidade, o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico que codifica uma proteína de membrana de um microorganismo infeccioso (em particular, que codifica uma proteína de envólucro e, mais preferencialmente, a E-glicoproteína de envólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento). O vetor lentiviral pode compreender um ácido nucléico que codifica a E glicoproteína truncada na terminação carboxila do Vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, por exemplo, uma E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de envólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1. Em outra modalidade, o ácido nucléico heterólogo codifica uma variante da E-glicoproteína de envólucro do Vírus do Nilo

Ocidental. Em uma modalidade, a invenção engloba um ácido nucléico heterólogo que se hibridiza, sob condições de hibridização rigorosa, àqueles descritos a seguir, por exemplo, a um ácido nucléico do Vírus do Nílo Ocidental cepa IS-98-ST1, que codifica a E-glicoproteína de envoltório.

Objetos e vantagens adicionais da invenção serão apresentados, em parte, na descrição a seguir e, em parte, serão óbvios com a descrição, ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os objetos e vantagens da invenção serão obtidos e atingidos por meio dos elementos e combinações particularmente indicadas nas reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a expressão de sE_{WNV} em células 293T transduzidas com TRIP/sE_{WNV}. (A) Representação esquemática do vetor TRIP/sE_{WNV}. O cDNA de IS-98-ST1 que codifica sE_{WNV} foi subclonado do plasmídeo TOPO/sE_{WNV} [29] no vetor lentiviral TRIP entre os sítios de clonagem BsiW1 e BssHII e sob o controle do promotor precoce imediato do citomegalovírus humano (CMVie). LTR = Repetição Terminal Longa. (B) Detecção da proteína sE_{WNV} em células 293T transduzidas com TRIP/sE_{WNV}. As células 293T foram transduzidas com a quantidade de partículas de vetor TRIP/sE_{WNV} equivalente a 100 ng/mL de antígeno p24 (esquerda), ou deixadas não transduzidas (direita). 48 horas após a transdução, as células 293T foram imunotinizadas com HMAF anti-WNV (Fluido Ascítico de Camundongo Hiperimune).

A figura 2 mostra a detecção de anticorpos anti-E_{WNV} em soros de camundongos vacinados com TRIP/sE_{WNV}. Células Vero foram infectadas com WNV cepa IS-98-ST1 (WNV) ou falsamente infectadas (sem vírus). Lisados celulares radiomarcados foram imunoprecipitados com soros imunes reunidos (diluição a 1:100). As amostras foram analisadas por SDS-15% PAGE sob condições não redutoras. (A) Soros de camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} coletados nos dias 6, 13, 20 e 27 após a imunização (p.i.) (B) Soros de camundongos BALB/c-MBT congênicos resistentes inoculados com WNV (soros para WNV). Anti-soros para vírus da linfocoriomeningite (LCMV) foram usados como um controle negativo. As glicoproteínas estruturais de WNV C, prM e E e as proteínas não estruturais NS3 e NS2A são

mostradas. (C) Soros de camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} coletados 21 dias após o desafio com WNV, que foi realizado 7 ou 14 dias após a imunização. Como controle positivo, antígenos virais foram imunoprecipitados com HMAF anti-WNV.

A figura 3 mostra que a inativação térmica de partículas de vetor TRIP/sE_{WNV} abole a transdução. Células 293T foram transduzidas com um vetor TRIP/GFP (66 ng de antígeno p24 por mL), inativadas termicamente (70°C durante 10 min) ou não. 48 h após a transdução, a expressão de GFP foi detectada por FACS.

A figura 4 mostra a seqüência de ácido nucléico (SEQ ID NO: 9) da forma secretada de E-glicoproteína de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1, com códons de partida e de parada adicionados nas extremidades da seqüência.

A figura 5 mostra a seqüência de ácido nucléico (SEQ ID NO: 10) da forma secretada de E-glicoproteína de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.

A figura 6 mostra a seqüência de ácido nucléico (SEQ ID NO: 11) da forma secretada de E-glicoproteína de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1. A seqüência de sinal na terminação N está sublinhada.

A figura 7 mostra a seqüência de aminoácidos do Domínio III (SEQ ID NO: 12) da E-glicoproteína de Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.

A figura 8 mostra a seqüência de ácido nucléico completa do vetor lentiviral pTRIPsE_{WNV} (SEQ ID NO: 13) portanto a seqüência heteróloga da E-glicoproteína de Vírus do Nilo Ocidental truncada do Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Foram descobertos vetores lentivirais para induzir respostas humorais protetoras. Em uma modalidade, os vetores lentivirais são vetores retrovirais deficientes em replicação, compreendendo seqüências ativas cis necessárias para a transcrição reversa (regiões PPT 3', PBS e R das LTRs), importação nuclear (cPPT-CTS) e integração (psi), e um ácido nucléico hete-

rólogo que codifica um antígeno. Nesta modalidade, proteínas estruturais e enzimáticas são fornecidas em "trans". Os vetores lentivirais podem compreender seqüências de repetição de integração (IR) e Tips da LTR, assim como seqüências transcricionais como ORF e promotores. A partícula de vetor lentiviral pode ser pseudotipada por qualquer invólucro viral ou não viral para facilitar sua entrada na célula alvo. Um sítio preferido no vetor lentiviral para inserção do ácido nucléico heterólogo está entre as dois LTRs, conforme explicado abaixo. Alternativamente, o ácido nucléico heterólogo pode ser, por exemplo, inserido nas regiões U3 ou U5 das LTRs, ou fornecido como um substituto para as regiões U3 ou U5 das LTRs.

Em uma modalidade, o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um peptídeo portando pelo menos um epítipo B. Em modalidades preferidas, o ácido nucléico heterólogo codifica uma proteína de membrana de um microorganismo infeccioso como, por exemplo, uma proteína de invólucro. Em uma modalidade preferida, o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento.

O termo "vetor lentiviral" significa que o vetor contém uma seqüência polinucleotídica que: (1) não está associada a todo ou a parte de um polinucleotídeo ao qual esteja associado na natureza, (2) está ligada a um polinucleotídeo diferente daquele ao qual está ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza. Vetores lentivirais da invenção englobam vetores derivados de, por exemplo, HIV-1, HIV-2, SIV (vírus da imunodeficiência símia), EIAV (vírus da anemia infecciosa eqüina), FIV (vírus da imunodeficiência felina), CAEV (vírus da artrite encefalite caprina) e VMV (vírus Visna/maedi). Vetores lentivirais também englobam lentivírus quiméricos derivados de pelo menos dois lentivírus diferentes.

Os termos "polipeptídeo" e "proteína", usados aqui de maneira intercambiável, referem-se a uma forma polimérica de aminoácidos de qualquer comprimento e inclui aminoácidos química ou bioquimicamente modificados ou derivatizados, assim como polipeptídios com estruturas principais peptídicas modificadas. O termo inclui proteínas de fusão, como proteínas

de fusão GST e proteínas PEGiladas, proteínas de fusão com uma seqüência de aminoácidos heteróloga, fusões com seqüências líderes heterólogas ou homólogas, com ou sem resíduos metionina N-terminais; proteínas imunologicamente etiquetadas; e outras.

Um "fragmento" de uma seqüência polipeptídica se refere a uma seqüência polipeptídica que seja mais curta que a seqüência de referência, mas que retenha uma função ou atividade biológica que seja reconhecida como a mesma do polipeptídio de referência. Essa atividade pode incluir, por exemplo, a capacidade de estimular uma resposta imune. Um fragmento retém pelo menos um epítipo do polipeptídio de referência.

O termo "purificado", conforme aqui usado, significa que um polipeptídio essencialmente livre de associação com outras proteínas ou polipeptídios, por exemplo, como um produto de purificação de cultura de células hospedeiras recombinantes ou como um produto purificado de uma fonte não recombinante. O termo "substancialmente purificado", conforme aqui usado, refere-se a uma mistura que contenha um polipeptídio e seja essencialmente livre de associação com outras proteínas ou polipeptídios, exceto pela presença de proteínas conhecidas que possam ser removidas usando-se um anticorpo específico, e esses polipeptídios substancialmente purificados podem ser usados como um antígeno.

O termo "antígeno", conforme aqui usado, significa uma substância capaz de estimular uma resposta imune. Antígenos preferidos englobam pelo menos um epítipo B, em que um epítipo B é capaz de gerar uma resposta imune humoral. Esses antígenos preferidos incluem, por exemplo, antígenos de superfície, como proteínas de invólucro ou outras de membrana, e seus fragmentos.

O termo "patógeno", conforme aqui usado, significa um agente causador específico de doença e pode incluir, por exemplo, qualquer bactéria, vírus ou parasita.

O termo "doença", conforme aqui usado, significa uma interrupção, cessação ou transtorno da função, sistema ou órgão do corpo. Doenças preferidas incluem doenças infecciosas.

O termo "imunidade humoral", conforme aqui usado, significa anticorpos gerados por um antígeno e todos os processos acessórios que a acompanham.

O termo "imunidade humoral protetora", conforme aqui usado, significa uma resposta imune humoral que confere o componente essencial de proteção contra um patógeno.

O termo "imunidade humoral esterilizante", conforme aqui usado, significa uma resposta imune humoral que impede o estabelecimento de qualquer infecção detectável por um patógeno.

O termo "imunidade humoral de longa duração", conforme aqui usado, significa que algum aspecto da imunidade humoral é detectável três meses após a administração do antígeno como, por exemplo, anticorpos gerados pelo antígeno. Métodos adequados de detecção de anticorpos incluem, mas não se limitam a, métodos como ELISA, imunofluorescência (IFA), testes de neutralização de redução de foco (FNRT), imunoprecipitação e Western Blotting.

O termo "resposta humoral neutralizadora", conforme aqui usado, significa que os anticorpos gerados durante a imunidade humoral bloqueiam diretamente a capacidade de um patógeno de infectar células.

O termo "resposta rápida", conforme aqui usado, significa que a imunidade humoral protetora é conferida até três semanas após a administração do antígeno. O termo "resposta muito rápida", conforme aqui usado, significa que a imunidade humoral protetora é conferida até uma semana após a administração do antígeno.

Reações de hibridização podem ser realizadas sob condições de diferente "rigor". Condições que aumentam o rigor de uma reação de hibridização são conhecidas na técnica. Por exemplo, condições rigorosas tanto para hibridização de DNA/DNA, quanto de DNA/RNA são descritas em Sambrook e Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Além disso, aqueles versados na técnica saberiam como modificar as condições quando necessário para o grau de rigor requerido para uma hibridização particular.

Exemplos de condições relevantes incluem (em ordem de rigor crescente); temperaturas de incubação de 25°C, 37°C, 50°C e 68°C; concentrações de tampão de 10 x SSC, 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC (em que 1 x SSC é 0,15 M de NaCl e 15 mM de tampão citrato) e seus equivalentes, usando outros sistemas de tampão; concentrações de formamida de 0%, 25%, 50% e 75%; tempos de incubação de 5 minutos a 24 horas; 1, 2 ou mais etapas de lavagem; tempos de incubação de lavagem de 1, 2 ou 15 minutos; e soluções de lavagem de 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC ou água desionizada.

Um exemplo de condições de hibridização rigorosas é a hibridização a 50°C e 0,1 x SSC (15 mM de cloreto de sódio/1,5 mM de citrato de sódio). Outro exemplo de condições de hibridização rigorosas é a incubação durante uma noite a 42°C em uma solução contendo 50% de formamida, 1 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), 5 x solução de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano e 20 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado e cisalhado, seguido por lavagem dos filtros em 0,1 x SSC a cerca de 65°C. Um exemplo adicional de condições de alto rigor inclui a hibridização aquosa (por exemplo, livre de formamida) em 6 x SSC (em que 20 x SSC contém 3,0 M de NaCl e 0,3 M de citrato de sódio), 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 65°C durante cerca de 8 horas (ou mais), seguido por uma ou mais lavagens em 0,2 x SSC, 0,1% de SDS a 65°C.

Um polipeptídeo "variante", conforme aqui citado, significa um polipeptídeo substancialmente homólogo ao polipeptídeo de referência, mas que tenham uma seqüência de aminoácidos diferente da de polipeptídeos de referência devido a uma ou mais deleções, inserções ou substituições. A seqüência de aminoácidos variante é, de preferência, pelo menos 90% idêntica ao polipeptídeo de referência e, o mais preferivelmente, pelo menos 95% idêntica. A porcentagem de identidade pode ser determinada, por exemplo, por comparação da informação de seqüência usando-se o programa de computador GAP, versão 6.0, descrito por Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) e disponível no Grupo de Computação Genética da Universi-

dade de Wisconsin (UWGCG). O programa GAP utiliza o método de alinhamento de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), conforme revisado por Smith e Waterman (Adv. Appl. Math 2:482, 1981). Os parâmetros de default preferidos para o programa GAP incluem: (1) uma matriz de comparação binária (contendo um valor de 1 para identidades e 0 para não identidades) para nucleotídeos, e a matriz de comparação ponderada de Gribskov e Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, conforme descrita por Schwartz e Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, Fundação Nacional de Pesquisa Biomédica, pp. 353-358, 1979; (2) uma penalidade de 3,0 para cada vão e uma penalidade de 0,10 adicional para cada símbolo em cada vão; e (3) nenhuma penalidade para vãos de extremidades.

Variantes podem compreender seqüências conservadoramente substituídas, significando que um dado resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo com características físico-químicas similares. Exemplos de substituições conservadoras incluem a substituição de um resíduo alifático por outro, como Ile, Val, Leu ou Ala entre si, ou substituições de um resíduo polar por outro, como entre Lys e Arg; Glu e Asp; ou Gln e Asn. Outras substituições conservadoras, por exemplo, substituições de regiões inteiras com características de hidrofobicidade similares, são bem-conhecidas. Variantes de polipeptídios de ocorrência natural também estão englobadas pela invenção. Exemplos dessas variantes são proteínas que resultam de eventos de junção de mRNA alternados ou de clivagem proteolítica dos polipeptídios. Variações atribuíveis a proteólise incluem, por exemplo, diferenças nas terminações por expressão em diferentes tipos de células hospedeiras, devido à remoção proteolítica de um ou mais aminoácidos terminais dos polipeptídios. Variações atribuíveis a deslocamento de quadro incluem, por exemplo, diferenças nas terminações por expressão em diferentes tipos de células hospedeiras, devido a diferentes aminoácidos.

O termo "se liga especificamente a", no contexto da ligação de anticorpos, refere-se à ligação de alta avidez e/ou alta afinidade de um anticorpo a um polipeptídio específico ou, mais precisamente, a um epítipo específico de um polipeptídio específico. A ligação do anticorpo a esse epítipo

é tipicamente mais forte que a ligação do mesmo anticorpo a qualquer outro epítipo ou qualquer outro polipeptídio que não compreenda o epítipo. Esse anticorpo é tipicamente produzido por injeção do polipeptídio específico em um animal para gerar a produção de anticorpos. Esse anticorpo pode ser capaz de se ligar a outros polipeptídios em um nível fraco, embora detectável (por exemplo, 10% ou menos da ligação mostrada ao polipeptídio de interesse). Essa ligação fraca, ou ligação de fundo, é prontamente discernível da ligação de anticorpo específico, por exemplo, com o uso de controles apropriados. Em geral, anticorpos da invenção se ligam especificamente a um polipeptídio específico com uma afinidade de ligação de 10^{-7} M ou mais, de preferência 10^{-8} M ou mais (por exemplo, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} e etc.).

Um "veículo farmacologicamente aceitável" se refere a uma carga sólida, semi-sólida ou líquida, diluente, material de encapsulação ou auxiliar de formulação não tóxico de qualquer tipo convencional. Um "veículo farmacologicamente aceitável" é não tóxico para os receptores às dosagens e concentrações empregadas e é compatível com outros ingredientes da formulação. Por exemplo, o veículo para uma formulação contendo polipeptídios de preferência não inclui agentes oxidantes e outros compostos que sejam sabidamente prejudiciais para polipeptídios. Veículos adequados incluem, mas não se limitam a, água, dextrose, glicerol, salina, etanol e suas combinações. O veículo pode conter agentes adicionais, como agentes umectantes ou emulsificadores, agentes de tamponamento de pH ou adjuvantes que intensifiquem a eficácia da formulação. Veículos tópicos incluem petróleo líquido, palmitato de isopropila, polietileno glicol, etanol (95%), monolaurato de polioxietileno (5%) em água, ou lauril sulfato de sódio (5%) em água. Outros materiais, como antioxidantes, umectantes, estabilizadores da viscosidade e agentes similares podem ser adicionados quando necessário. Intensificadores da penetração percutânea, como Azone, também podem ser incluídos.

A seqüência do genoma completo do Vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1 (ou STD) está disponível no GenBank número de acesso AF 481864 (GI: 19387527, versão de 21 de maio de 2002).

A invenção apresenta polipeptídios de E-glicoproteína de envólucro isolados ou purificados, ou homogêneos, do Vírus do Nilo Ocidental, tanto recombinantes, quanto não recombinantes. Variantes e derivados de polipeptídios de E-glicoproteína de envólucro nativa que podem ser usados como antígenos podem ser obtidos por mutações de seqüências nucleotídicas que codifiquem polipeptídios de E-glicoproteína de envólucro nativa. Alterações da seqüência de aminoácidos nativa podem ser feitas por qualquer um dos inúmeros métodos convencionais. As mutações podem ser introduzidas em loci particulares por síntese de oligonucleotídeos contendo uma seqüência mutante, flanqueados por sítios de restrição que permitam a ligação a fragmentos da seqüência nativa. Após a ligação, a seqüência reconstruída resultante codifica um análogo com a inserção, substituição ou deleção de aminoácido desejada.

Alternativamente, podem-se empregar procedimentos de mutagênese específicos para sítio e direcionados a oligonucleotídeo, para fornecer um gene alterado, em que códons predeterminados possam ser alterados por substituição, deleção ou inserção. Métodos exemplificativos da preparação das alterações acima expostas são apresentados por Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, janeiro de 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987); e patentes norte-americanas nº 4.518.584 e 4.737.462, todos aqui incorporados por referência.

Em um aspecto da invenção, o vetor lentiviral pode ser utilizado para preparar anticorpos que se liguem especificamente a polipeptídios. O termo "anticorpos" pretende incluir anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, seus fragmentos, como os fragmentos F(ab')₂ e Fab, assim como quaisquer parceiros de ligação produzidos de maneira recombinante. Os anticorpos são definidos como se ligando especificamente se eles se ligaram a polipeptídios de E-glicoproteína de envólucro com uma K_a maior que ou igual a cerca de $10^7 M^{-1}$. As afinidades de parceiros de ligação ou anticorpos

podem ser prontamente determinadas usando-se técnicas convencionais, por exemplo, aquelas descritas por Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660 (1949). Anticorpos policlonais podem ser prontamente gerados a partir de várias fontes, por exemplo, cavalos, vacas, cabras, ovelhas, cães, galinhas, coelhos, camundongos ou ratos, usando procedimentos bem-conhecidos na técnica.

Vetores de expressão recombinantes podem ser preparados usando-se métodos bem-conhecidos. Para uma revisão das técnicas de biologia molecular, vide Sambrook e Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press 2001, 3ª Ed. Os vetores de expressão podem incluir uma seqüência de enxerto, como a seqüência de E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental, operacionalmente ligada a seqüências nucleotídicas reguladoras de transcrição ou tradução adequadas, como aquelas derivadas de um gene de mamífero, micróbio, vírus ou inseto. Exemplos de seqüências reguladoras incluem promotores, operadores ou intensificadores de transcrição, um sítio de ligação ribossomal de mRNA e seqüências apropriadas que controlem o início e término de transcrição e tradução. As seqüências nucleotídicas estão "operacionalmente ligadas" quando a seqüência reguladora se relaciona funcionalmente com a seqüência de enxerto. Assim, uma seqüência nucleotídica promotora está operacionalmente ligada a uma seqüência de E-glicoproteína de invólucro se a seqüência nucleotídica promotora controlar a transcrição da seqüência de DNA da E-glicoproteína de invólucro. A capacidade de se replicar nas células hospedeiras desejadas, normalmente conferida por uma origem de replicação, e um gene de seleção pelo qual transformantes sejam identificados também podem ser incorporados no vetor de expressão.

Além disso, seqüências que codificam peptídios de sinal apropriados que não estejam naturalmente associados à seqüência de enxerto podem ser incorporados em vetores de expressão.

Células hospedeiras adequadas para expressão incluem procaríotos, levedura ou células eucarióticas superiores. Vetores de clonagem e expressão apropriados para uso com hospedeiros celulares bacterianos,

fúngicos, de levedura e de mamífero são descritos, por exemplo, em Poulwels et al. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nova Iorque (1985).

Uma vez que o vetor lentiviral da invenção tenha sido obtido, pode ser usado para produzir anticorpos policlonais e monoclonais. Assim, uma proteína ou polipeptídeo expressado *in vivo* ou *ex vivo* por meio do vetor lentiviral da invenção pode ser usado para imunizar um hospedeiro animal por técnicas conhecidas na técnica. Essas técnicas normalmente envolvem a inoculação, mas podem envolver outros modos de administração. Uma quantidade suficiente do vetor lentiviral é administrada para criar uma resposta imunogênica no hospedeiro animal. Pode-se usar qualquer hospedeiro que possa ser infectado por lentivírus. Uma vez que o animal tenha sido imunizado, e tempo suficiente tenha passado para começar a produzir anticorpos contra o antígeno, podem-se recuperar anticorpos policlonais. O método geral compreende a remoção de sangue do animal e a separação do soro do sangue. O soro, que contém anticorpos contra o antígeno, pode ser usado como um anti-soro para o antígeno. Alternativamente, os anticorpos podem ser recuperados do soro. A purificação por afinidade é uma técnica preferida para a recuperação de anticorpos policlonais contra o antígeno do soro.

Anticorpos monoclonais contra os antígenos da invenção também podem ser preparados. Um método para a produção de anticorpos monoclonais reativos com os antígenos compreende as etapas de infecção do hospedeiro com o vetor lentiviral; recuperação de células produtoras de anticorpos do baço do hospedeiro; fusão das células produtoras de anticorpos com células de mieloma deficientes na enzima hipoxantina-guanina fosforiltransferase para formar hibridomas; seleção de pelo menos um dos hibridomas por crescimento em um meio compreendendo hipoxantina, aminopterina e timidina; identificação de pelo menos um dos hibridomas que produz um anticorpo contra o antígeno, cultivo do hibridoma identificado para produzir anticorpos em uma quantidade recuperável; e recuperação dos anticorpos produzidos pelo hibridoma em cultura.

Esses anticorpos policlonais ou monoclonais podem ser usados em várias aplicações. Entre essas está a neutralização de proteínas correspondentes. Também podem ser usados para detectar antígenos virais em preparações biológicas ou na purificação das proteínas, glicoproteínas ou suas misturas correspondentes, por exemplo, quando usados em colunas cromatográficas de afinidade.

Os polipeptídios de E-glicoproteína de envólucro podem ser usados como antígenos para identificar anticorpos contra o Vírus do Nilo Ocidental em materiais e para determinar a concentração dos anticorpos nesses materiais. Assim, os antígenos podem ser usados para determinação qualitativa ou quantitativa do vírus em um material. Esses materiais incluem tecido animal e células animais, assim como fluidos biológicos, como fluidos corporais de animais, incluindo soros de animais. Quando usados como um reagente em um imunoenensaio para determinar a presença ou concentração dos anticorpos contra o Vírus do Nilo Ocidental, os antígenos proporcionam um ensaio que é conveniente, rápido, sensível e específico.

Mais particularmente, os antígenos podem ser empregados para a detecção de infecção por microorganismos patogênicos (em particular, Vírus do Nilo Ocidental) por meio de imunoenseaios que sejam bem conhecidos para uso na detecção ou quantificação de componentes humorais em fluidos. Assim, interações antígeno-anticorpo podem ser diretamente observadas ou determinadas por reações secundárias, como precipitação ou aglutinação. Além disso, também se podem empregar técnicas de imunoeletroforese. Por exemplo, pode-se utilizar a combinação clássica de eletroforese em ágar seguida por reação com anti-soro, assim como eletroforese bidimensional, eletroforese foguete e imunotiquetagem de padrões de gel de poliacrilamida (Western Blot ou imunotransferência). Outros imunoenseaios em que antígenos da presente invenção podem ser empregados incluem, mas não se limitam a, radioimunensaio, ensaio de imunoprecipitação competitiva, imunensaio de enzima e ensaio de imunofluorescência. Deve-se entender que se podem empregar técnicas turbidimétricas, colorimétricas e nefelométricas. Prefere-se um imunensaio baseado na técnica de Western

Blot.

Os imunoenaios podem ser realizados por imobilização de um dos imunorreagentes sobre a superfície de um veículo, enquanto se retém a imunorreatividade do reagente. O imunorreagente recíproco pode ser não etiquetado ou etiquetado, de modo que a imunorreatividade também seja retida. Essas técnicas são particularmente adequadas para uso em imunoenaios de enzima, como ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) e imunoensaio de enzima por inibição competitiva (CIEIA).

Quando qualquer um dos imunorreagentes está fixado em um suporte sólido, o suporte normalmente é um material de vidro ou plástico. Preferem-se materiais de plástico moldados na forma de placas, tubos, glóbulos ou discos. Exemplos de materiais de plástico adequados são poliestireno e cloreto de polivinila. Se o imunorreagente não se ligar prontamente ao suporte sólido, pode-se posicionar um material de veículo entre o reagente e o suporte. Exemplos de materiais de veículo adequados são proteínas, como albumina sérica bovina, ou reagentes químicos, como glutaraldeído ou uréia. O revestimento da fase sólida pode ser realizado usando-se técnicas convencionais.

A invenção apresenta um vetor lentiviral imunogênico e, mais particularmente, um vetor lentiviral protetor para gerar uma resposta protetora contra o Vírus do Nilo Ocidental. Esses vetores lentivirais podem ser, portanto, empregados como vacinas virais por administração do vetor lentiviral a um animal suscetível a um microorganismo patogênico (uma bactéria, um vírus, um parasita) e são utilizáveis na prevenção de infecções. Em uma modalidade, os vetores lentivirais da invenção compreendem um ácido nucleico heterólogo que codifica uma proteína de membrana de flavivírus, por exemplo, do Vírus do Nilo Ocidental, e são utilizáveis para prevenir infecções, por exemplo, infecção pelo Vírus do Nilo Ocidental. Podem-se empregar modos de administração convencionais. Por exemplo, a administração pode ser realizada pelas vias oral, respiratória, parenteral, via sublingual, via intranasal, via subcutânea ou via intradérmica.

As composições de vacina da invenção são administradas de

maneira compatível com a formulação da dosagem e em uma quantidade que seja terapeuticamente eficaz e imunogênica. A quantidade a ser administrada depende do sujeito a ser tratado, incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imune do indivíduo de induzir uma resposta imune.

O cronograma de imunização dependerá de vários fatores, como a suscetibilidade do hospedeiro à infecção, o peso do hospedeiro e a idade do hospedeiro. Uma única dose da vacina da invenção pode ser administrada ao hospedeiro, ou se pode seguir um curso primário de imunização, em que vários doses sejam administradas a intervalos de tempo. Doses subsequentes usadas como reforços podem ser administradas quando necessário após o curso primário.

Uma resposta imunogênica pode ser obtida por administração do vetor lentiviral da invenção ao hospedeiro em uma quantidade de cerca de 10 a cerca de 500 microgramas de antígeno por quilograma de peso corporal, de preferência de cerca de 50 a cerca de 100 microgramas de antígeno por quilograma de peso corporal. As proteínas e vacinas da invenção podem ser administradas juntamente com um veículo fisiologicamente aceitável. Por exemplo, pode-se empregar um diluente como água ou uma solução salina.

Para melhor atingir os objetivos de acordo com as finalidades da presente invenção, descreve-se um kit capaz de diagnosticar uma infecção por Vírus do Nilo Ocidental. Esse kit, em uma modalidade, contém os anticorpos desta invenção, que são capazes de se ligarem à E-glicoproteína de invólucro do Vírus do Nilo Ocidental. Esse kit, em outra modalidade, contém os polipeptídeos desta invenção, que são capazes de detectar a presença ou ausência de anticorpos que se ligam ao polipeptídeo de E-glicoproteína de invólucro.

Esta invenção será descrita em maiores detalhes nos Exemplos a seguir.

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Cultura celular e preparações de vírus. Células 293T humanas e células Vero de rim de macaco verde africano foram cultivadas em meio Ea-

gle modificado de Dulbecco (DMEM) Glutamax (GIBCO) suplementado com 10% ou 5% de Soro de Novilho Fetal (FCS) inativado por calor, respectivamente. A cepa IS-98-ST1 de WNV (GenBank número de acesso AF 481864) [31], uma variante intimamente relacionada à cepa NY99 [32 – 34], foi propagada em monocamadas de células AP61 de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*. A purificação em gradientes de sacarose e a titulação do vírus em células AP61 por ensaio de imunodeteção de foco (FIA) usando Fluido Ascítico de Camundongo Hiperimune anti-WNV (HMAF) foram efetuadas conforme anteriormente descrito [29, 31, 35]. Os títulos de infectividade foram expressos como Unidades Formadoras de Focos (FFU).

Construção e produção do vetor lentiviral. O cDNA de 1,4 kb que codifica a E glicoproteína truncada na terminação carboxila, sem a região de ancoragem transmembrana (resíduos E-1 a E-441; chamado de sE_{WNV}) de WNV cepa IS-98-ST1 é descrito em outro lugar [29]. O cDNA que codifica sE_{WNV} já foi modificado por PCR para ser flanqueado nas extremidades de quadro de leitura aberta por sítios de endonucleases de restrição BsiWI e BssHII. O cDNA foi digerido com BsiWI e BssHII e, então, clonado nos sítios BsiWI e BssHII únicos do plasmídeo pTRIP ΔU3 CMV. O plasmídeo de vetor resultante pTRIP.ΔU3.CMV.sE_{WNV} (daqui por diante chamado de pTRIP/sE_{WNV}) contém a seqüência de sE glicoproteína de IS-98-ST1 sob o controle do promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMVie).

Partículas de vetor foram produzidas por co-transfecção com fosfato de cálcio transitória de células 293T com o plasmídeo de vetor pTRIP/sE_{WNV}, um plasmídeo de encapsidação (p8.7; [36]), e um plasmídeo de expressão de invólucro VSV-G (pHCMV-G; [37]) conforme anteriormente descrito [38]. A quantificação do teor de antígeno p24 de partículas de vetor concentradas foi feita com um kit de ELISA HIV-1 p24 comercial (Perkin Elmer LifeSciences).

PCR quantitativa. Para a detecção das seqüências de U5-R no vetor lentiviral, os iniciadores e sondas usados foram os seguintes: sondas LTR-FL 5'-CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-fluoresceína-3' (SEQ ID NO:1), LTR-LC 5'-RED640-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC-fosforilada-3'

(SEQ ID NO:2), iniciadores AA55M

5'-GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA-3' (SEQ ID NO:3), M667 δ -GGCTAACTAGGGAACCCACTG-S' (SEQ ID NO:4) [39]. Para a detecção de CD3, as seqüências dos iniciadores e sondas foram as seguintes: sondas CD3-P1

5'-GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-fluoresceína-3' (SEQ ID NO:5), CD3-P2

5'-RED705-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC-fosforilada-S' (SEQ ID NO:6) e iniciadores CD3-in-F δ -GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA-S' (SEQ ID NO:7) e CD3-in-R 5'-CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-S' (SEQ ID NO:8). Os iniciadores e sondas foram sintetizados por Proligo (França). O DNA genômico de aproximadamente $3,10^6$ células 293T transduzidas com vetor lentiviral foi isolado 48 h após a transdução usando o Minikit de DNA no Sangue QIAamp® (QIAGEN, GmbH, Hilden). Para a análise de PCR em tempo real, 5 μ L de DNA foram misturados com 15 μ L de uma mistura-mestra de PCR consistindo em 1X Jumpstart® Taq ReadyMix® (Sigma), 1,9 mM de MgCl₂, 1,5 μ M de iniciadores direto e reverso (AA55M/M667 ou CD3-in-F/CD3-in-R), 200 nM das sondas (LTR-FL/LTR-LC ou CD3-P1/CD3-P2) e 1,5 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em um LightCycler 2.0 (Roche Applied Science), usando um ciclo de 95°C durante 3 min e 40 ciclos de 95°C durante 5 s, 55°C durante 15 s e 72°C durante 10 s. Para levar em consideração qualquer possível contaminação com plasmídeo dos estoques de vetor, DNA de células 293T transduzidas com vetor inativado com calor (10 min a 70°C) foi sempre testado em paralelo. Para controles negativos, usaram-se 5 μ L de DNA genômico de células não transduzidas. Cada amostra de DNA foi testada em duplicata, e se relataram os valores médios. Diluições seriadas de dez vezes de concentração conhecida do plasmídeo pTripCD3, contendo as seqüências relevantes U5-R e CD3, foram amplificadas em paralelo com amostras de DNA para gerar uma curva padrão.

O número total de cópias de vetor por célula foi calculado por normalização do número de cópias de U5-R com relação ao número de célu-

las 293T, conforme quantificado pelo número de cópias de moléculas de CD3 na mesma amostra de DNA genômico, e, então, subtração do número de cópias obtidas das células transduzidas com vetor e inativadas com calor.

Anti-soros de camundongo contra WNV. Fluido Ascítico de Camundongo Hiperimune anti-WNV (HMAF) foi obtido por imunização repetida de camundongos adultos com WNV cepa IS-98-ST1, seguido por inoculação de sarcoma 180. Os soros contra WNV foram obtidos por imunização de camundongos congênicos BALB/c-MBT resistentes a WNV com 10^3 FFU de IS-98-ST1, conforme anteriormente descrito [31]. Anticorpos anti-WNV policlonais de camundongo foram coletados 1 mês após a inoculação.

Imunização de camundongos e desafio com WNV. Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Escritório do Laboratório de Cuidados com Animais do Instituto Pasteur. Camundongos 129 de seis a oito semanas de idade foram inoculados por intraperitoneal (i.p.) com doses variáveis de partículas de vetor TRIP/sE_{WNV} em 0,1 mL de PBS de Dulbecco (DPBS; pH 7,5) suplementado com albumina sérica bovina a 0,2% tamponada (DPBS/0,2% de BSA, Sigma). O desafio com WNV foi realizado por inoculação i.p. da cepa neurovirulenta de WNV IS-98-ST1 (DL_{50} i.p. = 10 FFU), conforme anteriormente descrito [29, 31]. Os camundongos desafiados foram monitorizados diariamente quanto a sinais de morbidade ou mortalidade, durante até 21 dias.

Medição das respostas de anticorpos séricos. Os camundongos foram sangrados pela via periorbital, e os soros foram inativados com calor durante 30 min a 56°C. Os anticorpos anti-WNV foram detectados por ELISA usando WNV IS-98-ST1 purificado com sacarose como antígeno viral [29, 31]. Imunoglobulina anticamundongo conjugada a peroxidase (H+L) (Jackson Immuno Research) a uma diluição de 1:4.000 e IgM (específica para cadeia μ) ou IgG (específica para cadeia γ) anticamundongo conjugada a peroxidase (Sigma) a uma diluição de 1:20.000 foram usadas como anticorpos secundários. O título final foi calculado como a recíproca da última diluição que gerava duas vezes a densidade óptica (DO) de soros de camundongos inoculados com TRIP/GFP que serviram de controles negativos.

Anticorpos neutralizadores anti-WNV foram detectados por um teste de neutralização por redução de foco (FRNT) em células Vero, conforme anteriormente descrito [29]. O título final foi calculado como a recíproca ou a diluição de soro mais elevada testada que reduzia o número de FFU em 90% (FRNT₉₀).

Ensaio de radioimunoprecipitação. Células Vero cultivadas em um balão de 25 cm² foram infectadas com WNV cepa IS-98-ST1 a uma alta multiplicidade de infecção. 20 h após a infecção, as células foram submetidas a fome durante 1 h em DMEM depletado de metionina (ICN Biomedicals) e radiomarcadas com 100 µCi/mL de Trans³⁵S-Label™/mL (ICN Biomedicals) durante 3 h. Depois de três lavagens com PBS frio, as células foram lisadas com tampão de lise RIPA (50 mM de Tris-Cl, 150 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,5% de desoxicolato, 0,1% de SDS, pH 8,0) suplementado com 25 µg/mL de aprotinina (Sigma) durante 10 min a 4°C. Os lisados de células foram, então, clarificados por centrifugação a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C. O ensaio de radioimunoprecipitação (RIP) foi efetuado conforme anteriormente descrito [29, 40]. Os antígenos virais foram imunoprecipitados com anticorpos anti-WNV de camundongo. As amostras foram analisadas por SDS-15% de PAGE sob condições não redutoras.

Ensaio de imunofluorescência indireta e citometria de fluxo. Para a análise de imunofluorescência indireta (IF), células 293T humanas cultivadas em um Glass-Labteks de 8 câmaras (Nunc) foram transduzidas com partículas de vetor TRIP/sE_{WNV}. Após 48 h, as células foram fixadas com paraformaldeído a 3% (PFA) em PBS durante 20 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS durante 4 min. As células foram incubadas com um HMAF anti-WNV a uma diluição de 1:100 em PBS durante 1 h. Após bloqueio com DPBS/0,2% de BSA, as células foram adicionalmente incubadas com um anticorpo IgG anticamundongo conjugado a Cy3 (Amersham Pharmacia) a uma diluição de 1:500 em DPBS/0,2% de BSA. Os núcleos das células foram visualizados com DAPI. As lâminas foram examinadas usando-se um microscópio Zeiss Axioplan com o sistema ApoTome.

Para a análise de citometria de fluxo, células 293T cultivadas em balões de 25 cm² foram transduzidas com TRIP/GFP, inativado com calor (70°C durante 10 min) ou não. Em 48 h, as células foram soltas, lavadas e fixadas com 2% de PFA. A intensidade de fluorescência de GFP foi medida por FACS e analisada com o software CellQuest.

Exemplo 2: Expressão da forma secretada da E glicoproteína de WNV pelo vetor lentiviral TRIP recombinante

Para avaliar se a imunização com uma vacina à base de vetor lentiviral pode proteger contra encefalite por WNV, gerou-se um vetor lentiviral, TRIP/sE_{WNV}, que expressa uma forma solúvel da E glicoproteína do WNV cepa IS-98-ST1 (sE_{WNV}) sob o controle do promotor precoce imediato de CMV (CMV_{i.e.}) (figura 1A). Demonstramos anteriormente a secreção eficiente de sE_{WNV} no meio de cultura de células infectadas por um vetor de sarampo recombinante [29]. A expressão de sE_{WNV} em células 293T transduzidas com vetor lentiviral foi examinada por imunofluorescência (figura 1B). 48 h após a transdução, uma alta fração de células foram imunotíngidas com um padrão que sugere que o sE_{WNV} migrou através da via secretória.

A quantidade de partículas físicas no estoque de vetor usado neste estudo foi determinada por um ensaio ELISA comercialmente disponível contra a proteína de capsídeo de HIV-1 p24 (Perkin Elmer Lifescience). O título real do estoque de vetor foi calculado com base na transferência do DNA do vetor para células alvo, usando um ensaio de PCR quantitativa. A quantificação tanto de uma seqüência específica do vetor (U5), quanto de um locus celular (CD3) fornece o número de cópias de DNA de vetor médio por célula. Isso permite uma titulação precisa da preparação de vetor. O estoque de vetor TRIP/sE_{WNV} usado neste estudo foi titulado em células 293T humanas a 5,2 x 10⁷ unidades de transdução (TU) por mL (correspondendo a aproximadamente 900 TU/ng de p24 em células 293T humanas). Por razões de simplicidade, será expressada, nas seções a seguir, a quantidade de partículas de vetor usada como ng de antígeno p24.

Exemplo 3: Uma única imunização com TRIP/sE_{WNV} induz fortes respostas de anticorpos

Para avaliar a resposta imune humoral induzida pelo vetor lenti-viral que expressa sE_{WNV}, grupos de camundongos 129 adultos foram inoculados i.p. com uma única dose de partículas de vetor equivalente a 500 ng de antígeno p24. Os vetores codificavam sE_{WNV} ou proteína GFP como controle. Os camundongos foram sangrados periorbitalmente 6, 13, 20 ou 27 dias após a imunização, e os soros individuais ou reunidos foram testados quanto a anticorpos totais anti-WNV, IgG e IgM usando-se um ELISA específico para isotipo já descrito [29]. A atividade neutralizadora in vitro dos soros foi ensaiada por um teste de neutralização de redução de foco (FRNT) [29].

Nenhum anticorpo anti-WNV foi detectado nos soros de camundongos de controle imunizados com TRIP/GFP. Soros de camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} foram primeiro testados individualmente, e diferenças muito pequenas entre os animais foram observadas (média \pm DP no dia 6 = $0,5 \pm 0,3$; dia 13 = $1,3 \pm 0,5$; dia 21 = $1,3 \pm 0,15$; dia 27 = $1,4 \pm 0,15$), assim, nos experimentos seguintes, foram usados soros reunidos. Em camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV}, os anticorpos totais contra WNV era detectáveis tão cedo quanto 6 dias após a imunização, embora presentes em uma baixa concentração. Como esperado nesse momento, apenas anticorpos IgM anti-WNV foram detectados nos soros imunes. As respostas de anticorpos totais aumentaram 10 vezes até atingir um platô no dia 13, e foram, então, mantidas com o tempo. Nesses momentos posteriores (dia 13, 20, 27), os anticorpos IgM desapareceram, para serem substituídos por IgG (Tabela 1). Esses soros eram reativos com E-glicoproteína de WNV de lisados de células Vero infectadas com IS-98-ST1, conforme demonstrado pelo ensaio RIP (figura 2A).

Um teste de neutralização de redução de foco (FRNT) mostrou que os soros de camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} continham níveis detectáveis de anticorpos anti-WNV neutralizadores tão cedo quanto 6 dias após a imunização (Tabela 1). Juntos, esses dados mostram que se monta uma resposta imune de anticorpos anti-WNV precoce e específica em camundongos inoculados com uma única dose de partículas de vetor TRIP/sE_{WNV}.

Tabela 1. Resposta de anticorpos de camundongos inoculados com TRIP/sE_{WNV}

Vetor de imunização ^a	Título de anticorpos contra WNV ^b	Título de anticorpos IgM contra WNV ^b	Título de anticorpos IgG contra WNV ^b	FRNT ₉₀ anti-WNV ^c
Dia de sangramento				
TRIP/GFP				
Dia 27	ND	ND	ND	< 10
TRIP/sE _{WNV}				
Dia 6	3.000	300	ND	10
Dia 13	30.000	ND	1.000	10
Dia 20	30.000	ND	1.000	10
Dia 27	30.000	ND	1.000	20

a. Grupos de 6 camundongos 129 adultos foram inoculados i.p. com uma quantidade de partículas de vetor lentiviral correspondendo a 500 ng de antígeno p24.

Exemplo 4: Imunização com TRIP/sE_{WNV} confere proteção precoce de camundongos contra encefalite por WNV

Para se estabelecer se a imunidade humoral gerada em camundongos após a vacinação com TRIP/sE_{WNV} era protetora, tirou-se vantagem de um modelo de camundongo para desafio com WNV. De fato, algumas cepas de camundongos são extremamente sensíveis ao desafio com WNV [31, 41], desenvolvem uma doença neuroinvasiva letal similar à encontrada em seres humanos [32, 42] e morrem poucos dias após a inoculação. Grupos de camundongos 129 que receberam uma única dose de 500 ng de p24 de partículas de vetor TRIP/sE_{WNV} ou TRIP/GFP foram desafiados por via i.p. com 1.000 DL₅₀ i.p. de WNV cepa IS-98-ST1 uma ou duas semanas depois do primeiro contato.

Notavelmente, todos os camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} foram protegidos contra o desafio viral (1.000 DL₅₀ i.p.) tão cedo quanto 7 dias após o primeiro contato. Todos os camundongos imunizados

com o vetor de controle TRIP/GFP ou com DPBS morreram até 11 dias após o desafio (Tabela 2). De maneira interessante, os anticorpos totais contra WNV aumentaram dez vezes após o desafio, sugerindo que uma resposta secundária eficaz era montada em camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} (Tabela 2). Resultados equivalentes foram obtidos em camundongos BALB/c (dados não mostrados). Esses resultados indicam que a vacinação com TRIP/sE_{WNV} confere uma resposta imune protetora muito rápida e completamente protetora contra um desafio de alto WNV.

Tabela 2. Proteção rápida por TRIP/sE_{WNV} contra infecção por WNV

Vetor de imunização ^a , dia do desafio	Proteção ^b (nº de sobreviventes/nº de infectados)	Título de anticorpos contra WNV após o desafio ^c
DPBS		
Dia 7	0/2	NA
Dia 14	0/2	NA
TRIP/GFP		
Dia 7	0/2	NA
Dia 14	0/2	NA
TRIP/sE _{WNV}		
Dia 7	6/6	200.000
Dia 14	6/6	300.000

a. Grupos de camundongos 129 adultos foram inoculados i.p. com uma única dose de partículas de vetor lentiviral correspondendo a 500 ng de antígeno p24 ou com DPBS.

Exemplo 5: Imunização com TRIP/sE_{WNV} gera imunidade antiviral esterilizante

Para determinar se uma primo-infecção com WNV pode ocorrer ou não em animais vacinados com o desafio, realizaram-se ensaios RIP em soros reunidos de camundongos imunizados, coletados antes e 21 dias depois do desafio com WNV.

A proteína E era primeiro detectável por ensaio RIP no dia 13 após a imunização usando-se soros reunidos de camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} (figura 2A). A falta de detecção de anticorpos contra E em soros imunes de uma semana pode ser atribuída à baixa avidéz da proteína

A por IgM em nosso ensaio RIP. Soros de camundongos de controle imunizados com TRIP/GFP não reagiram com proteína E de WNV.

De maneira importante, soros pós-desafio de camundongos vacinados com TRIP/sE_{WNV} não precipitaram nenhuma proteína viral além da E (figura 2C). Essa falta de reatividade contra quaisquer proteínas de WNV diferentes da E (como preM e proteínas não estruturais NS2a, NS2b e NS3) indica claramente a ausência de uma replicação de WNV in vivo com o desafio em animais vacinados. Nos camundongos da cepa BALB/c-MBT, que é resistente à encefalite por WNV, os soros são prontamente reativos com todas as proteínas virais (figura 2B). Assim, a vacinação com TRIP/sE_{WNV} confere imunidade esterilizante completa a camundongos.

Exemplo 6: A proteção conferida por uma única injeção de TRIP/sE_{WNV} é de longa duração.

A seguir, determinamos se uma única imunização com a vacina à base de vetor lentiviral tem o potencial de gerar imunidade protetora de longo prazo contra infecção por WNV. Grupos de camundongos 129 foram imunizados por via i.p. com partículas de vetor TRIP/sE_{WNV} equivalentes a 500 ng de antígeno p24 ou com a mesma quantidade de vetor TRIP/GFP como controle. Três meses depois, os camundongos foram sangrados periorbitalmente, e os soros reunidos de cada grupo foram testados por ELISA e FRNT. Os níveis de anticorpos em camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} ainda eram notavelmente altos 3 meses após uma única injeção de vetor (1:30.000), e os anticorpos neutralizadores persistiam (Tabela 3). Os camundongos foram, então, desafiados por via i.p. com uma DL₅₀ de 1.000 de WNV IS-98-ST1. Nem morbidade nem mortalidade foram observadas em camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV}, ao passo que todos os camundongos de controle morreram em até 10 dias (Tabela 3). Os títulos de anticorpos totais, assim como os anticorpos anti-WNV neutralizadores aumentaram após o desafio, sugerindo que uma resposta secundária eficaz era montada em camundongos imunizados com TRIP/sE_{WNV} três meses antes (Tabela 3).

Assim, uma única dose do vetor lentiviral que codifica sE_{WNV} é

eficiente para conferir imunidade protetora de longo prazo em camundongos.

Tabela 3. Proteção de longo prazo por TRIP/sE_{WNV} contra infecção por WNV

Vetor de imunização ^a	Título de anticorpos contra WNV ^b (pré-desafio)	FRNT ₉₀ anti-WNV ^c (pré-desafio)	Proteção ^d n ^o de sobreviventes/n ^o de infectados	Título de anticorpos contra WNV ^b (pós-desafio)	FRNT ₉₀ anti-WNV ^c (pós-desafio)
TRIP/GFP	ND	< 10	0/3	NA	NA
TRIP/sE _{WNV}	30.000	20	13/13	500.000	400

a. Grupos de camundongos 129 adultos foram imunizados por via i.p. com partículas de vetor lentiviral correspondendo a 500 ng de antígeno p24.

b. Determinado por ELISA em soros reunidos inativados com calor.

c. FRNT: Teste de Neutralização de Redução de Foco: a diluição de soro mais alta que reduzia o número de FFU de WNV em pelo menos 90%.

d. Os camundongos foram inoculados i.p. com DL₅₀ de 1.000 de WNV cepa IS-98-ST1, três meses após a imunização. A sobrevivência foi registrada durante 21 dias.

ND: não detectado (< 100)

NA: não aplicável

Exemplo 7: Uma única dose diminuta de TRIP/sE_{WNV} confere proteção total e rápida

Para determinar a dose de vacina protetora mínima, grupos de camundongos 129 foram inoculados uma vez com uma ampla faixa de doses de vacina TRIP/sE_{WNV}, variando de 1,5 ng a 500 ng de antígeno p24. Uma semana após o primeiro contato, os camundongos imunizados foram desafiados por via i.p. com DL₅₀ de 1.000 de WNV IS-98-ST1. Como esperado, todos os camundongos que receberam 500 ng de p24 do vetor TRIP/GFP de controle morreram até 11 – 13 dias após o desafio. Uma proteção de 100% foi conseguida após a injeção de uma única dose de vetor TRIP/sE_{WNV} tão baixa quanto 50 ng de p24. Doses menores conferiram apenas proteção parcial, permitindo, assim, calcular uma dose protetora de 50%.

em camundongos adultos de 6,2 ng de antígeno p24 (Tabela 4). Deve-se notar que esses experimentos de dose-proteção foram realizados nas condições de desafio mais rigorosas, com um desafio precoce no dia 7 após a vacinação e com um inóculo de desafio viral altamente letal (DL_{50} de 1.000). Como as concentrações de anticorpos totais aumentaram dez vezes entre os dias 7 e 14 (Tabela 1), é provável que a dose protetora de 50% teria sido ainda menor que 6,2 ng se determinada apenas uma semana depois.

Esses resultados demonstram que uma dose diminuta de partículas de vetor conseguem uma imunidade rápida e completamente protetora em camundongos. Essa proteção de 100% é consequência de uma transdução de células *in vivo* real pelas partículas de vetor. Um tratamento térmico (10 min a 70°C) das partículas de vetor que abroga a capacidade de transdução de vetores lentivirais (figura 3) também abroga a proteção (Tabela 4), descartando a possibilidade de uma proteção conferida por DNA de plasmídeo ou proteínas sE_{WNV} residuais contaminando o estoque de vetor.

Tabela 4. Proteção dependente da dose por TRIP/sE_{WNV} contra infecção por WNV

Vetor de imunização ^a , dose (ng de p24)	Proteção ^b nº de sobreviventes/nº de infectados	Título de anticorpos contra WNV ^c pós-desafio
TRIP GFP		
500	0/6	NA
TRIP/sE _{WNV} inativado com calor ^d		
50	0/6	NA
TRIP/sE _{WNV}		
500	6/6	200.000
150	6/6	300.000
50	12/12	300.000
15	5/6	300.000
5	2/5	200.000
1,5	1/12	NA

a. Grupos de camundongos 129 adultos foram inoculados *i.p.* com uma única dose de partículas de vetor lentiviral.

b. Os camundongos foram inoculados *i.p.* com DL_{50} de 1.000 de WNV cepa IS-98-ST1 uma semana após o primeiro contato. A sobrevivência foi regis-

trada durante 21 dias.

c. Determinado por ELISA em soros reunidos inativados com calor.

d. As partículas de vetor lentiviral foram inativadas com calor durante 10 min a 70°C.

NA: não aplicável

Esta invenção apresenta a primeira evidência de que vetores lentivirais são ferramentas eficientes para gerar uma resposta imune humoral protetora contra um patógeno. Além da capacidade agora bem-descrita desses vetores de induzir fortes respostas imunes celulares [12 – 15, 17, 18, 21], este trabalho alarga a aplicabilidade de vetores lentivirais como ferramentas de vacinação contra patógenos para os quais uma resposta humoral neutralizadora seja um braço ativo do sistema imune.

O vetor TRIP/sE_{WNV} foi capaz de induzir uma resposta imune muito precoce, de longa duração e completamente protetora contra WNV, independentemente da dose letal usada em camundongos. De maneira importante, essa imunidade foi conseguida por uma única imunização com uma dose diminuta de partículas de vetor.

Essas características fazem do TRIP/sE_{WNV} um candidato a vacina promissor contra WNV. Em particular, a necessidade urgente de uma vacina veterinária eficiente que possa ser usada em populações animais suscetíveis no caso de um surto de WNV justifica ensaios envolvendo o vetor TRIP/sE_{WNV} lentiviral em animais, particularmente cavalos e aves. Além disso, a imunização profilática de grandes grupos de animais com vacinas à base de vetor lentiviral também serviria como provas de conceitos de toxicidade e segurança sólidas, proporcionando a percepção necessária e, por fim, pavimentando o caminho para o possível uso de vetores lentivirais como ferramentas de vacinação profilática em seres humanos.

Várias linhas de argumentos tornam o vetor lentiviral TRIP/sE_{WNV} um poderoso candidato a vacina para uso veterinário. Em primeiro lugar, a proteção conferida ocorre logo após a imunização. Isso poderia ser de grande importância no contexto de um surto de WNV, em que uma rápida proteção de animais sensíveis é crucial. A natureza exata dessa resposta imune

protetora precoce não foi totalmente determinada. Uma semana após a imunização, anticorpos IgG ainda não são detectáveis, e anticorpos IgM provavelmente representam a proteção observada. Demonstrou-se que a transferência passiva de IgM anti-WNV policlonal protege camundongos contra o desafio com WNV, demonstrando o papel crítico desse isotipo no controle das fases iniciais da infecção por WNV [43]. Todavia, não pode-se excluir a contribuição de respostas celulares inatas ou adaptativas contra antígenos de WNV para a proteção precoce observada [44]. Em segundo lugar, o vetor lentiviral TRIP/sE_{WNV} é completamente eficaz com uma única dose diminuta. Isso torna esse candidato a vacina interessante em termos de custo e poderia permitir o desenvolvimento de protocolos para vacinação em massa, de interesse particular para a proteção de galinhas. É importante notar que a dose requerida para uma imunidade protetora completa poderia ter sido ainda superestimada em nosso protocolo experimental com camundongo. De fato, demonstrou-se que células muríneas têm uma permissividade menor a transdução de vetor lentiviral do que outras células de mamíferos, incluindo células de seres humanos (dados não mostrados e [4, 45]). Células de aves mostram uma melhor permissividade à transdução do que células muríneas (dados não mostrados), permitindo prever que doses diminutas de vacina de vetor lentiviral seriam eficazes em aves. Além disso, a dose protetora de 50% de 6,2 ng de antígeno p24 das partículas de vetor TRIP/sE_{WNV} foi calculada sob as condições de desafio mais rigorosas (desafio precoce no dia 7 após a vacinação e uma dose letal de DL₅₀ de 1.000). Dado que as concentrações de anticorpos totais aumentam dez vezes entre os dias 7 e 14, a dose protetora de 50% provavelmente teria sido ainda menor do que 6,2 ng se calculada apenas uma semana depois. Em terceiro lugar, em virtude do tropismo ubíquo do invólucro VSV-G usado para pseudotipagem das partículas de vetor [37], a vacina de vetor lentiviral pode ser teoricamente usada, sem nenhuma modificação, em qualquer espécie de vertebrado: cavalos, aves e mamíferos de zoológico em risco. Uma consideração final é que a imunidade protetora conferida pelo vetor é esterilizante, nenhuma replicação viral ocorre após o desafio com WNV. Isso poderia representar uma importante van-

tagem se a vacina tivesse de ser usada para imunização de aves. De fato, embora se acredite que cavalos, seres humanos e outros mamíferos sejam hospedeiros finais da infecção com WNV, sabe-se que as aves são hospedeiros amplificadores e que participam na manutenção de uma epidemia [30]. Além disso, a literatura recente mostra que hamsters experimentalmente infectados com WNV que sobrevivem à doença aguda podem continuar a espalhar WNV infeccioso na urina durante até 52 dias [46]. Se isso puder ser generalizado a outros mamíferos suscetíveis ao WNV, uma vacina esterilizante poderia se tornar crucial para o controle da epidemia de WNV.

Várias vacinas de WNV para uso veterinário foram propostas. Uma licenciada nos EUA em 2003 para cavalos é um vírus inativado e com adjuvante (website do Fort Dodge: www.equinewestnile.com). Essa preparação inativada gera respostas humorais de baixa magnitude em cavalos e, portanto, requer várias injeções, seguidas por reforços anuais. Essa vacina de vírus morto não gera anticorpos neutralizadores em flamingos chilenos e gaviões de cauda vermelha [47]. Uma varíola de canário recombinante que codifica as proteínas preM/E do WNV também foi licenciada em 2004 [48]. Entretanto, esse candidato também requer duas injeções a intervalos de 5 semanas. Nenhuma dessas vacinas confere proteção absoluta aos cavalos vacinados. Outras estratégias, como DNA nu que codifica proteínas pre M e E de WNV [28] também são consideradas.

Candidatos a vacinas contra WNV estão sendo desenvolvidos, na maioria dos casos, para uso humano. Demonstrou-se que uma vacina de sarampo viva que expressa a forma secretada da E-glicoproteína de WNV protege eficientemente camundongos contra encefalite por WNV [29]. Duas vacinas vias atenuadas recombinantes, WNV/febre amarela quimérica e WNV/Dengue 4, contendo os genes pre M e E do WNV clonado na estrutura principal da cepa de vacina 17D do vírus da febre amarela ou do vírus da dengue 4, foram testadas. Estudos pré-clínicos em camundongos e macacos mostram que ambas as vacinas são protetoras contra desafio com WNV [49 – 51]. Entretanto, o uso de vírus vivo atenuado quimérico poderia apresentar preocupações de segurança: a recombinação entre diferentes espécies de

flavivírus é possível, conforme demonstrado por flavivírus recombinantes de ocorrência natural [52, 53].

O potencial de uso de vacinas à base de vetor lentiviral, para uso humano ou veterinário, requer um projeto cuidadoso do vetor e estudos de segurança pré-clínica rigorosos. Preocupações de segurança quanto ao uso de vetores integrativos são justificadas em vista dos recentes relatos de casos de leucemia no ensaio SCID. X1. Esses efeitos adversos graves estão diretamente relacionados à integração do vetor retroviral derivado de Moloney em íntima proximidade do proto-oncogene LMO2 em células tronco hematopoiéticas [54].

Entretanto, as aplicações de vacinação com vetores lentivirais apresenta menores riscos. Em oposição à terapia genética à base de células tronco, que envolve a ampla proliferação de células transduzidas e a persistência da modificação genética durante toda a vida do paciente, células transduzidas em um cenário de vacinação expressam o antígeno relevante e, portanto, são alvos da resposta imune gerada. Acredita-se que células que expressam o antígeno, APCs ou não, sejam eliminadas do organismo vacinado em semanas ou meses. Além disso, no caso particular da vacinação por injeções subcutâneas ou intravenosas, demonstrou-se que partículas de vetor lentiviral pseudotipadas VSV-G têm como alvo essencialmente DCs [13, 18], uma APC profissional que não se divide com curta meia-vida in vivo após a ativação. Todavia, tanto o tropismo celular do vetor, quanto a falta de persistência das seqüências do vetor de vacinação, dependendo da via de injeção e dose do vetor, terão de ser cuidadosamente determinados para cada protocolo de vacinação.

Vetores lentivirais parecem ser ferramentas promissoras para vacinação contra o Vírus do Nilo Ocidental e provavelmente outras zoonoses ou patógenos emergentes.

Outras modalidades da invenção ficarão claras para aqueles versados na técnica depois de se considerar o relatório e a prática da invenção aqui exposta. Pretende-se que o relatório e os exemplos sejam considerados como apenas exemplificativos, com o verdadeiro âmbito e espírito da invenção sendo indicados pelas reivindicações a seguir.

Referências

1. Sirven A, Pflumio F, Zennou V, et al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000; 96:4103-4110.
2. Zennou V, Serguera C, Sarkis C, et al. The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 2001; 19:446-450.
3. Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM, et al. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol* 1999; 73:7812-7816.
4. Giannini C, Morosan S, Tralhao JG, et al. A highly efficient, stable, and rapid approach for ex vivo human liver gene therapy via a FLAP lentiviral vector. *Hepatology* 2003; 38:114-122.
5. Kootstra NA, Matsumura R, and Verma IM. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. *Mol Tfter* 2003; 7:623-631.
6. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, et al. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 2000; 290:767-773.
7. Benhamida S, Pflumio F, Dubart-Kupperschmitt A, et al. Transduced CD34+ cells from adrenoleukodystrophy patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Mol Ther* 2003; 7:317- 324.
8. Biffi A, De Palma M, Quattrini A, et al. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004; 113:1118-1129.
9. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001; 294:2368-2371.
10. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* 2004;104:3445-3453.
11. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 2005; 11:429-433.

12. Breckpot K, Dullaers M, Bonehill A, et al. Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J Gene Med* 2003; 5:654-667.
13. Esslinger C, Chapatte L, Finke D, et al. In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J CHn Invest* 2003; 111:1673-1681.
14. Esslinger C, Romero P, and MacDonald HR. Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13:1091-1100.
15. Firat H, Zennou V, Garcia-Pons F, et al. Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. Perspectives for immunotherapy. *J Gene Med* 2002; 4:38-45.
16. He Y, Zhang J, Mi Z, et al. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol* 2005; 174:3808-3817.
17. Metharom P, Ellem KA, Schmidt C, et al. Lentiviral vector-mediated tyrosinase-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma. *Hum Gene Ther* 2001; 12:2203-2213.
18. Palmowski MJ, Lopes L, Ikeda Y, et al. Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response. *J Immunol* 2004; 172:1582-1587.
19. Dylla J, Latouche JB, Schnell S, et al. Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2001; 97:114-121.
20. Rohrlich PS, Cardinaud S, Lule J, et al. Use of a lentiviral vector encoding a HCMV-chimeric IE1-pp65 protein for epitope identification in HLA- Transgenic mice and for ex vivo stimulation and expansion of CD8(+) cytotoxic T cells from human peripheral blood cells. *Hum Immunol* 2004; 65:514-522.
21. Zarei S, Abraham S, Arrighi JF, et al. Lentiviral transduction of dendritic cells confers protective antiviral immunity in vivo. *J Virol* 2004; 78:7843- 7845.
22. VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, et al. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen- presenting cells in

vivo. *Blood* 2002;100:813-822.

23. Engle MJ, and Diamond MS. Antibody prophylaxis and therapy against West Nile virus infection in wild-type and immunodeficient mice. *J Virol* 2003; 77:12941-12949.
24. Diamond MS, Shrestha B, Marri A, et al. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol* 2003; 77:2578-2586.
25. Ben-Nathan D, Lustig S, Tarn G, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile virus infection in mice. *J Infect Dis* 2003; 188:5-12.
26. Beasley DW, and Barrett AD. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J Virol* 2002; 76: 13097-13100.
27. Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, et al. Immunization of mice against West Nile virus with recombinant envelope protein. *J Immunol* 2001; 167:5273-5277.
28. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol* 2001; 75:4040-4047.
29. Despres P, Combredet C, Frenkiel MP, et al. Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. *J Infect Dis* 2005; 191:207-214.
30. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, et al. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:343-355.
31. Mashimo T, Lucas M, Simon-Chazottes D, et al. A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11311-11316.
32. Lucas M, Frenkiel MP, Mashimo T, et al. The Israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old World. *Virol J* 2004; 1:9.

33. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* 2002;298:96-105.
34. Charrel RN, Brault AC, Gallian P, et al. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 2003; 315:381-388.
35. Despres P, Frenkiel MP, and Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 1993; 196:209-219.
36. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997; 15:871-875.
37. Yee JK, Miyanochara A, LaPorte P, et al. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:9564- 9568.
38. Zennou V, Petit C, Guetard D, et al. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 2000; 101: 173-185.
39. Brussel A, and Sonigo P. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* 2003; 77: 10119-10124.
40. Despres P, Griffin JW, and Griffin DE. Effects of anti-E2 monoclonal antibody on sindbis virus replication in AT3 cells expressing bcl-2. *J Virol* 1995; 69:7006-7014.
41. Deubel V, Fiette L, Gounon P, et al. Variations in biological features of West Nile viruses. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 195-206.
42. Ceccaldi PE, Lucas M, and Despres P. New insights on the neuropathology of West Nile virus. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233:1-6.
43. Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, et al. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med* 2003; 198:1853- 1862.
44. Shrestha B, and Diamond MS. Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J Virol* 2004; 78:8312-8321.
45. Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, et al. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepa-

toocytes. *Mol Ther* 2002; 6: 199-209.

46. Tonry JH, Xiao SY, Siirin M, et al. Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:320-324.
47. Nusbaum KE, Wright JC, Johnston WB, et al. Absence of humoral response in flamingos and red-tailed hawks to experimental vaccination with a killed West Nile virus vaccine. *Avian Dis* 2003; 47:750-752.
48. Minke JM, Siger L, Karaca K, et al. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Arch Virol Suppl* 2004:221-230.
49. Arroyo J, Miller C, Catalan J, et al. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J Virol* 2004; 78: 12497-12507.
50. Pletnev AG, Putnak R, Speicher J, et al. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3036-3041.
51. Pletnev AG, Claire MS, Elkins R, et al. Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology* 2003; 314: 190-195.
52. Seligman SJ, and Gould EA. Live flavivirus vaccines: reasons for caution. *Lancet* 2004; 363:2073-2075.
53. Gould EA, Moss SR, and Turner SL. Evolution and dispersal of encephalitic flaviviruses. *Arch Virol Suppl* 2004:65-84.
54. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302:415-419.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> INSTITUT PASTEUR
 CHARNEAU, PIERRE
 DESPRES, PHILIPPE

<120> VACINA À BASE DE VETOR LENTIVIRAL

<130> BLOcp226/135PCT

<140> 11/250,616

<141> 2005-10-17

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sonda sintética

<400> 1

cacaacagac gggcacacac tacttga

27

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sonda sintética

<400> 2

cactcaaggc aagctttatt gaggc

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador Sintético

<400> 3

gctagagatt ttccacactg actaa

25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador Sintética

<400> 4

ggctaactag ggaaccact g

21

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sonda sintética

<400> 5

ggctgaaggt tagggatacc aatattcctg tctc

34

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sonda sintética

<400> 6

ctagtgatgg gctcttcct tgagccctc

30

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador sintética

<400> 7

ggctatcatt cttcttcaag gta

23

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador sintética

<400> 8

cctctcttca gccatttaag ta

22

<210> 9

<211> 1380

<212> DNA

<213> Vírus West Nile

<400> 9

atgagagttg tgtttgctg gctattgctt ttggtggccc cagcttacag cttcaactgc 60
 cttggaatga gcaacagaga cttcttgga ggagtgtctg gagcaacatg ggtggatttg 120
 gttctcgaag gcgacagctg cgtgactatc atgtctaagg acaagcctac catcgatgtg 180
 aagatgatga atatggaggc ggtcaacctg gcagaggtcc gcagttattg ctatttggtc 240
 accgtcagcg atctctccac caaagctgcg tgcccgaacca tgggagaagc tcacaatgac 300
 aaacgtgctg acccagcttt tgtgtgcaga caaggagtgg tggacagggg ctggggcaac 360

ggctgcgat tatttgcaa aggaagcatt gacacatgcg ccaaatttgc ctgctctacc 420
 aaggcaatag gaagaaccat cttgaaagag aatatcaagt acgaagtggc cttttttgtc 480
 catggacca ctactgtgga gtcgcacgga aactactcca cacaggttgg agccactcag 540
 gcagggagat tcagcatcac tcctgcgcg ccttcataca cactaaagct tggagaatat 600
 ggagaggtga cagtggactg tgaaccacgg tcagggattg acaccaatgc atactacgtg 660
 atgactgttg gaacaaagac gttcttggtc catcgtgagt ggttcatgga cctcaacctc 720
 ccttgagca gtgctggaag tactgtgtgg aggaacagag agacgttaat ggagtttgag 780
 gaaccacacg ccacgaagca gtctgtgata gcattgggct cacaagaggg agctctgcat 840
 caagctttgg ctggagccat tcctgtggaa ttttcaagca aactgtcaa gttgacgtcg 900
 ggtcatttga agtgtagagt gaagatggaa aaattgcagt tgaagggaa aacctatggc 960
 gtctgttcaa aggctttcaa gtttcttggg actcccgcag acacaggtca cggcactgtg 1020
 gtgttggaat tgcagtacac tggcacggat ggaccttgca aagttcctat ctogtcagtg 1080
 gcttcattga acgacctaac gccagtgggc agattgggca ctgtcaacct tttgtttca 1140
 gtggccacgg ccaacgctaa ggtcctgatt gaattggaac cacccttgg agactcatac 1200
 atagtggtag ccagaggaga acaacagatc aatcaccatt ggcacaagtc tggagcagc 1260
 attggcaaaag cctttacaac caccctcaaa ggagcgcaga gactagccgc tctaggagac 1320
 acagcttggg actttggatc agttggaggg gtgttcacct cagttgggaa ggctgtctaa 1380

<210> 10

<211> 1374

<212> DNA

<213> Virus West Nile

<400> 10

agagttgtgt ttgtcgtgct attgcttttg gtggccccag cttacagctt caactgcctt 60
 ggaatgagca acagagactt cttggaagga gtgtctggag caacatgggt ggatttgggt 120
 ctcgaaggcg acagctgctg gactatcatg tctaaggaca agcctaccat cgatgtgaag 180
 atgatgaata tggaggcggg caacctggca gaggtccgca gttattgcta tttggctacc 240
 gtacagcgtc tctccaccaa agctgctgct cgcaccatgg gagaagctca caatgacaaa 300
 cgtgctgacc cagcttttgt gtgcagacaa ggagtgggtg acaggggctg gggcaacggc 360
 tgcggattat ttggcaaagg aagcattgac acatgcccga aatttgctg ctctaccaag 420
 gcaataggaa gaaccatctt gaaagagaat atcaagtacg aagtggccat tttgtccat 480
 ggaccaacta ctgtggagtc gcacggaaac tactccacac aggttggagc cactcaggca 540
 gggagattca gcatcactcc tgcggcgctc tcatacacac taaagcttgg agaataatga 600
 gaggtgacag tggactgtga accacgggca gggattgaca ccaatgcata ctacgtgatg 660
 actgttggaa caaagacggt cttggtccat cgtgagtggt tcatggacct caacctcct 720
 tggagcagtg ctggaagtac tgtgtggagg aacagagaga cgtaaatgga gtttgaggaa 780
 ccacacgcca cgaagcagtc tgtgatagca ttgggctcac aagagggagc tctgcatcaa 840
 gctttggctg gagccattcc tgtggaattt tcaagcaaca ctgtcaagtt gacgtcgggt 900
 catttgaagt gttagtgtaa gatggaaaaa ttgcagttga agggaacaac ctatggcgtc 960
 tgttcaaagg ctttcaagtt tcttgggact cccgcagaca caggtcacgg cactgtggtg 1020
 ttggaattgc agtactactg cacggatgga ccttgcaaaag ttcctatctc gtcagtggtg 1080
 tcattgaacg acctaacgcc agtgggcaga ttggtcactg tcaaccctt tgtttcagtg 1140
 gccacggcca acgtaaggt cctgattgaa ttggaaccac cctttggaga ctacatacata 1200
 gtggtgggca gaggagaaca acagatcaat caccattggc acaagtctgg aagcagcatt 1260
 ggcaaagcct ttacaaccac cctcaaagga gcgcagagac tagccgctct aggagacaca 1320
 gcttgggact ttgatcagt tggaggggtg ttcacctcag ttgggaaggc tgtc 1374

<210> 11

<211> 458

<212> PRT

<213> Virus West Nile

<400> 11

Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser
 20 25 30

Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr
 35 40 45

Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met
 50 55 60

Glu Ala Val Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala
 85 90 95
 His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val
 100 105 110
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 115 120 125
 Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg
 130 135 140
 Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His
 145 150 155 160
 Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly
 165 170 175
 Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro
 195 200 205
 Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr
 210 215 220
 Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro
 225 230 235 240
 Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met
 245 250 255
 Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly
 260 265 270
 Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val
 275 280 285
 Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys
 290 295 300
 Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val
 305 310 315 320
 Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His
 325 330 335
 Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys
 340 345 350
 Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val
 355 360 365
 Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn
 370 375 380
 Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
 385 390 395 400
 Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser
 405 410 415

Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln
 420 425 430

Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly
 435 440 445

Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val
 450 455

<210> 12
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Vírus West Nile

<400> 12
 Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly
 20 25 30

Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn
 35 40 45

Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser
 50 55 60

Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe
 65 70 75 80

Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile
 85 90

<210> 13
 <211> 4555
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Sequência Sintética de Vetor lenti-
 viral pTRIP/Ewnv

<400> 13
 tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatatacct tgatctgtgg atctaccaca 60
 cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
 tgacctttgg atggtgctac aagctagtagc cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180
 acaaaggaga gaaccaccagc ttgttacaac ctgtgagcct gcatgggatg gatgaccg 240
 agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac ggtggcccga 300
 gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatacgag cttgctacaa gggactttcc 360
 gctggggggac tttccaggga ggctggcct gggcgggact ggggagtggc gagccctcag 420
 atcctgcata taagcagctg ctttttgctt gtactgggtc tctctgggta gaccagatct 480
 gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc 540
 cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgta ctctggtaac tagagatccc 600
 tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg cgcccgaaca gggacttgaa 660
 agcgaagagg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact cggcttctg aagcgcggaa 720
 ttccgcgcca cggcaagagg cgaggggagg cgactggtga gtacgcaaa aattttgact 780
 agcggaggct agaaggagag agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt 840
 agatcgcgat gggaaaaaat tcggttaagg ccagggggaa agaaaaaata taaattaa 900
 catatagtat gggcaagcag ggagctagaa cgattcgcag ttaatcctgg cctggttagaa 960
 acatcagaag gctgtagaca aatactggga cagctacaac catcccttca gacaggatca 1020
 gaagaactta gatcattata taatacagta gcaaccctct attgtgtgca tcaaaggata 1080
 gagataaaag acaccaagga agctttagac aagatagagg aagagcaaaa caaagtaag 1140
 accaccgac agcaagcggc cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgaggggaca 1200
 ttggagaagt gaattatata aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc 1260
 caccaaggca aagagaagag tgggtgcagag agaaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt 1320

gttocttggg	ttcttgggag	cagcaggaag	cactatgggc	gcagcgtcaa	tgacgctgac	1380
ggtacaggcc	agacaattat	tgtctgggat	agtgcagcag	cagaacaatt	tgctgagggc	1440
tattgaggcg	caacagcatc	tgttgcaact	cacagtctgg	ggcatcaagc	agctccaggc	1500
aagaatcctg	gctgtggaaa	gatacctaaa	ggatcaacag	ctcctgggga	tttggggttg	1560
ctctggaaaa	ctcatttgca	ccactgctgt	gccttggaat	gctagtggga	gtaataaatc	1620
tctggaacag	atttggaaac	acacgacctg	gatggagtgg	gacagagaaa	ttaacaatta	1680
cacaagctta	atacactcct	taattgaaga	atcgcaaaac	cagcaagaaa	agaatgaaca	1740
agaattattg	gaattagata	aatgggcaag	tttgtggaat	tggtttaaca	taacaaattg	1800
gctgtgggat	ataaaattat	tcataatgat	agtaggaggc	ttggtagggt	taagaatagt	1860
ttttgctgta	ctttctatag	tgaatagagt	taggcaggga	tattcaccat	tatcgtttca	1920
gaccacctc	ccaaccccga	ggggacccga	caggcccgaa	ggaatagaag	aagaagggtg	1980
agagagagac	agagacagat	ccattcgatt	agtgaacgga	tctcgacggt	atcgccgaat	2040
tcacaaatg	cagtattcat	ccacaatfff	aaaagaaaag	gggggattgg	ggggtacagt	2100
gcaggggaaa	gaatagtaga	cataatagca	acagacatac	aaactaaaga	attacaaaaa	2160
caaattacaa	aaattcaaaa	ttttcggggt	tattacaggg	acagcagaga	tccactttgg	2220
ggcgataaag	ttgggagttc	cgcgttacat	aacttacggt	aaatggccc	cctggtcgtg	2280
cgcccaacga	ccccgccc	ttgacgtcaa	taatgacgta	tggtcccata	gtaacgcca	2340
tagggacttt	ccattgacgt	caatgggtgg	agtatttacg	gtaaactgcc	cacttggcag	2400
tacatcaagt	gtatcatatg	ccaagtacgc	cccctattga	cgtaaatgac	ggtaaatggc	2460
ccgcttggca	ttatgcccag	tacatgacct	tatgggactt	tcctacttgg	cagtacatct	2520
acgtattagt	catcgctatt	accatgggtg	tgcggttttg	gcagtacatc	aatgggctgt	2580
gatagcgggt	tgactcacgg	ggatttccaa	gtctccacc	cattgacgtc	aatgggagtt	2640
tgttttggca	ccaaaatcaa	cgggactttc	caaaatgtcg	taacaactcc	gccccattga	2700
cgcaaatggg	cggtaggcgt	gtacggtggg	aggtctatat	aagcagagct	cgtttagtga	2760
accgtcagat	cgcttggaga	cgccatccac	gctgttttga	cctccataga	agacaccgac	2820
tctagaggac	gtacgatgag	agttgtggtt	gtcgtgctat	tgcttttgg	ggccccagct	2880
tacagcttca	actgccttgg	aatgagcaac	agagacttct	tggaaaggag	gtctggagca	2940
acatgggtgg	atgtggttct	cgaaggcgac	agctgctgta	ctatcatgtc	taaggacaag	3000
cctaccatcg	atgtgaagat	gatgaatatg	gaggcgggtc	acctggcaga	ggtccgcagt	3060
tattgctatt	tggtctaccg	cagcgatctc	tccaccaag	ctgcgtgcc	gaccatggga	3120
gaagctcaca	atgacaaacg	tgctgacca	gcttttgtgt	gcagacaagg	agtggtggac	3180
aggggctggg	gcaacggctg	cggattatft	ggcaaaagg	gcattgacac	atgcccacaa	3240
tttgccctgct	ctaccaaggc	aataggaaga	accatcttga	aagagaatat	caagtacgaa	3300
gtggccattt	ttgtccatgg	accaactact	gtggagtgc	acggaaacta	ctccacacag	3360
gttggagcca	ctcaggcagg	gagattcagc	atcactcctg	cggcgccttc	atacacacta	3420
aagcttggag	aatatggaga	ggtgacagtg	gactgtgaac	cacggtcagg	gattgacacc	3480
aatgcatact	acgtgatgac	tgttggaaca	aagacgttct	tggtccatcg	tgagtggttc	3540
atggacctca	acctcccttg	gagcagtgtc	ggaagtactg	tggtggagg	cagagagacg	3600
ttaatggagt	ttgaggaacc	acacgccacg	aagcagtctg	tgatagcatt	gggtcacaca	3660
gagggagctc	tgcatcaagc	tttggctgga	gccattcctg	tggaattttc	aagcaacact	3720
gtcaagttga	cgtcgggtca	tttgaagtgt	agagtgaaga	tggaaaaatt	gcagttgaag	3780
ggaacaacct	atggcgtctg	ttcaaaggct	ttcaagtffc	ttgggactcc	cgcagacaca	3840
ggtcacggca	ctgtgggtgt	ggaattgcag	tacactggca	cggatggacc	ttgcaaagtt	3900
cctatctcgt	cagtggcttc	attgaacgac	ctaacgccag	tgggcagatt	ggtcactgtc	3960
aacccttttg	tttcagtggc	cacggccaac	gctaaggctc	tgattgaatt	ggaaccacc	4020
tttggagact	catacatagt	ggtgggcaga	ggagaacaac	agatcaatca	ccattggcac	4080
aagtctggaa	gcagcattgg	caaagccttt	acaaccacc	tcaaaggagc	gcagagacta	4140
gccgctctag	gagacacagc	ttgggacttt	ggatcagttg	gaggggtggt	cacctcagtt	4200
gggaaggctg	tctaattgcg	gcggtacctt	taagaccaat	gacttacaag	gcagctgtag	4260
atcttagcca	ctttttaaaa	gaaaaggggg	gactggaagg	gctaattcac	tcccaacgaa	4320
gacaagatcg	tcgagagatg	ctgcatataa	gcagctgctt	tttgcctgta	ctgggtctct	4380
ctggttagac	cagatctgag	cctgggagct	ctctggctaa	ctaggggaacc	cactgcttaa	4440
gcctcaataa	agcttgctt	gagtgcttca	agtagtgtgt	gcccgtctgt	tgtgtgactc	4500
tggttaactag	agatccctca	gaccctttta	gtcagtgtgg	aaaatctcta	gcagt	4555

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um vetor lentiviral, compreendendo um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que a expressão do antígeno em uma célula de um animal provoca uma resposta imune no dito animal, para a
5 preparação de um medicamento capaz de produzir anticorpos quando administrado ao dito animal.
2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno é selecionado do grupo que consiste em um antígeno de superfície e um antígeno de membrana.
- 10 3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a resposta humoral induz uma imunidade protetora em um animal necessitado, a dita imunidade protetora sendo uma imunidade protetora de longa duração ou uma imunidade esterilizadora.
4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a
15 3, em que a expressão do antígeno induz imunidade protetora contra um microorganismo patogênico.
5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, em que o microorganismo patogênico é um flavivírus.
6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, em que o microorganismo patogênico é o vírus do Nilo Ocidental.
- 20 7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que o ácido nucléico heterólogo codifica uma E-glicoproteína de invólucro, seu fragmento ou uma variante da dita E-glicoproteína de invólucro de vírus do Nilo Ocidental.
- 25 8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, em que o dito fragmento é selecionado no grupo que consiste em E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, e E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de invólucro de vírus do
30 Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.
9. Uso de um vetor lentiviral, compreendendo um ácido nucléico heterólogo selecionado do grupo que consiste em um ácido nucléico heteró-

logo que codifica uma proteína de superfície de um microorganismo, ou seu fragmento, e uma variante de uma proteína de membrana superficial ou seu fragmento, com um veículo e/ou adjuvante fisiológico aceitável, para a preparação de uma vacina contra uma infecção por microorganismos, capaz de ser administrada a um animal necessitado, uma ou mais vezes.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, em que o microorganismo é o vírus do Nilo Ocidental, e em que o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína de envólucro do vírus do Nilo Ocidental, sua variante ou seu fragmento, com um veículo e/ou adjuvante fisiológico aceitável.

10 11. Uso, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que o vetor lentiviral é administrado por uma via intraperitoneal, via intravenosa, via intramuscular, via oral, via mucosa, via sublingual, via subcutânea, via intranasal ou via intradérmica.

15 12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, em que o vetor lentiviral é administrado por uma via intramuscular, e em que o animal necessitado é um cavalo.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 11, em que o vetor lentiviral é administrado por uma via intranasal ou uma via intradérmica, e em que o animal necessitado é um ser humano.

20 14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 9 a 13, em que o ácido nucléico heterólogo codifica um fragmento de uma E-glicoproteína de envólucro do vírus do Nilo Ocidental selecionado no grupo que consiste em E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, e E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de envólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.

25 15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 9 a 14, em que o vetor lentiviral é administrado uma vez e compreende uma dose de partículas de vetor equivalente a 0,5 ng a 5.000 ng de antígeno p24, de preferência uma dose de partículas de vetor equivalente a 0,5 ng a 50 ng de antígeno p24 e, mais preferivelmente, uma dose de partículas de vetor equivalente a 50 a 500 ng de antígeno p24.

16. Composição imunogênica compreendendo um vetor lentiviral, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno em uma quantidade suficiente para induzir uma resposta imunogênica ou protetora in vivo, e um veículo farmacologicamente aceitável para ele.

17. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 16, em que o ácido nucléico heterólogo codifica uma proteína de superfície de um microorganismo, ou seu fragmento.

18. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 16, em que o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína de envoltório de um flavivírus, ou seu fragmento.

19. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 18, em que o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína de envoltório de um vírus do Nilo Ocidental ou seu fragmento.

20. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 19, em que o ácido nucléico heterólogo é selecionado do grupo que consiste em um ácido nucléico heterólogo que codifica E-glicoproteína truncada na terminação carboxila do vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, ácido nucléico heterólogo que codifica E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de envoltório de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1, e ácido nucléico heterólogo que codifica uma variante da E-glicoproteína de envoltório do vírus do Nilo Ocidental.

21. Vetor lentiviral que dirige a expressão de um ácido nucléico heterólogo, em que o ácido nucléico heterólogo codifica E-glicoproteína do vírus do Nilo Ocidental, sua variante ou seus fragmentos, e em que o vetor compreende um promotor selecionado de promotor precoce imediato de citomegalovírus, promotor CAG, promotor EF1alfa, promotor PGK, promotor SVer0 e promotor MND.

22. Vetor lentiviral, de acordo com a reivindicação 21, em que o ácido nucléico heterólogo é selecionado do grupo que consiste em um ácido nucléico heterólogo que codifica E-glicoproteína truncada na terminação

carboxila do vírus do Nilo Ocidental, sem a região de ancoragem transmembrana, e ácido nucléico heterólogo que codifica E-glicoproteína truncada na terminação carboxila compreendendo os resíduos 1 – 441 da E-glicoproteína de invólucro de vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1.

5 23. Vetor lentiviral, de acordo com a reivindicação 22, em que o vetor compreende pTRIP/sE_{WNV}.

 24. Célula hospedeira substancialmente purificada, transfectada ou transduzida com o vetor lentiviral como definido em qualquer uma das reivindicações de 21 a 23.

10 25. Método para a produção de polipeptídio da E-glicoproteína de invólucro do vírus do Nilo Ocidental, sua variante ou seu fragmento, compreendendo o cultivo de uma célula hospedeira como definido na reivindicação 24 sob condições que promovam a expressão, e recuperação do polipeptídio da célula hospedeira ou do meio de cultura.

15 26. Vetor lentiviral que dirige a expressão de um ácido nucléico heterólogo, em que o vetor compreende o promotor precoce imediato de citomegalovírus, e em que o ácido nucléico heterólogo compreende proteína fluorescente verde.

20 27. Célula hospedeira substancialmente purificada, transfectada ou transduzida com o vetor lentiviral como definido na reivindicação 26.

 28. Uso de um vetor lentiviral compreendendo um ácido nucléico heterólogo que codifica um antígeno, e em que o antígeno gera anticorpos contra o agente patogênico, para a preparação de uma vacina contra um agente patogênico, capaz de ser administrada a um animal necessitado.

25 29. Uso, de acordo com a reivindicação 28, em que a administração do vetor lentiviral gera anticorpos de imunidade humoral ou neutralizadores de longa duração contra o agente patogênico.

 30. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 e 29, em que o vetor lentiviral compreende um ácido nucléico que codifica E-glicoproteína de invólucro do vírus do Nilo Ocidental, ou seu fragmento, e em
30 que o agente patogênico é o vírus do Nilo Ocidental.

 31. Uso, de acordo com a reivindicação 30, em que a E-glico-

proteína de envólucro do vírus do Nilo Ocidental não possui uma região de ancoragem transmembrana.

32. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 31, em que a administração de vetor lentiviral compreende pelo menos uma dose de partículas de vetor equivalente a 0,5 a 5.000 ng de antígeno p24.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 3, 9 ou 28, em que o animal necessitado é selecionado de seres humanos, cavalos, pássaros, galinhas, porcos, gado, roedores, animais de estimação e répteis.

10 34. Uso, de acordo com a reivindicação 7, 9, 20 ou 21, ou método, como definido na reivindicação 25, em que o ácido nucléico heterólogo codifica uma variante da E-glicoproteína de envólucro do vírus do Nilo Ocidental e se hibridiza sob condições de hibridização rigorosa a qualquer fita de um ácido nucléico do vírus do Nilo Ocidental cepa IS-98-ST1 que codifique a
15 E-glicoproteína de envólucro.

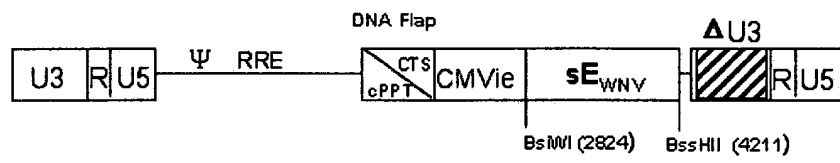
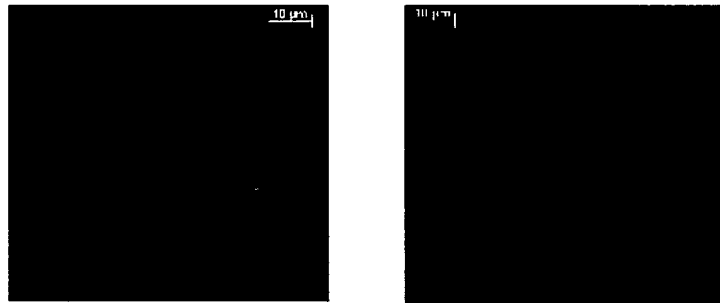
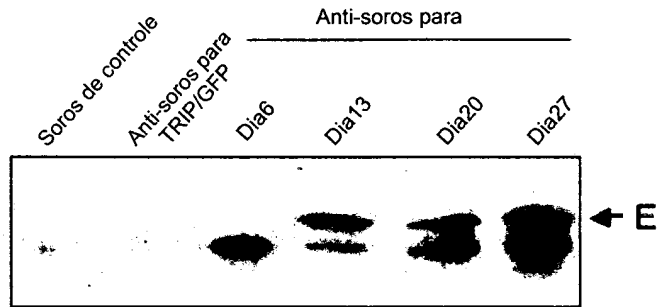
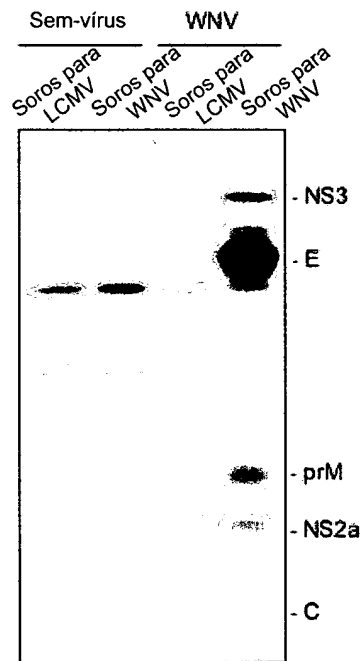
A.**B.**

FIG. 1

A.



B.



C.

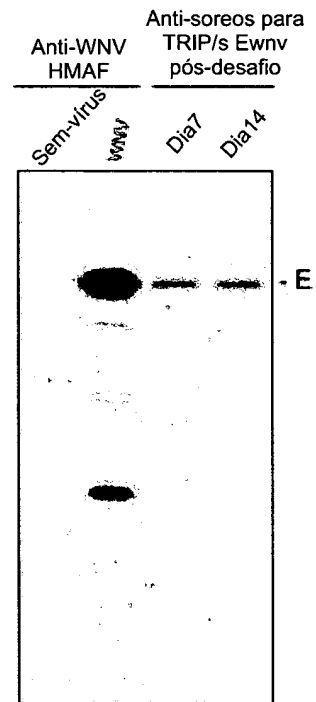


FIG. 2

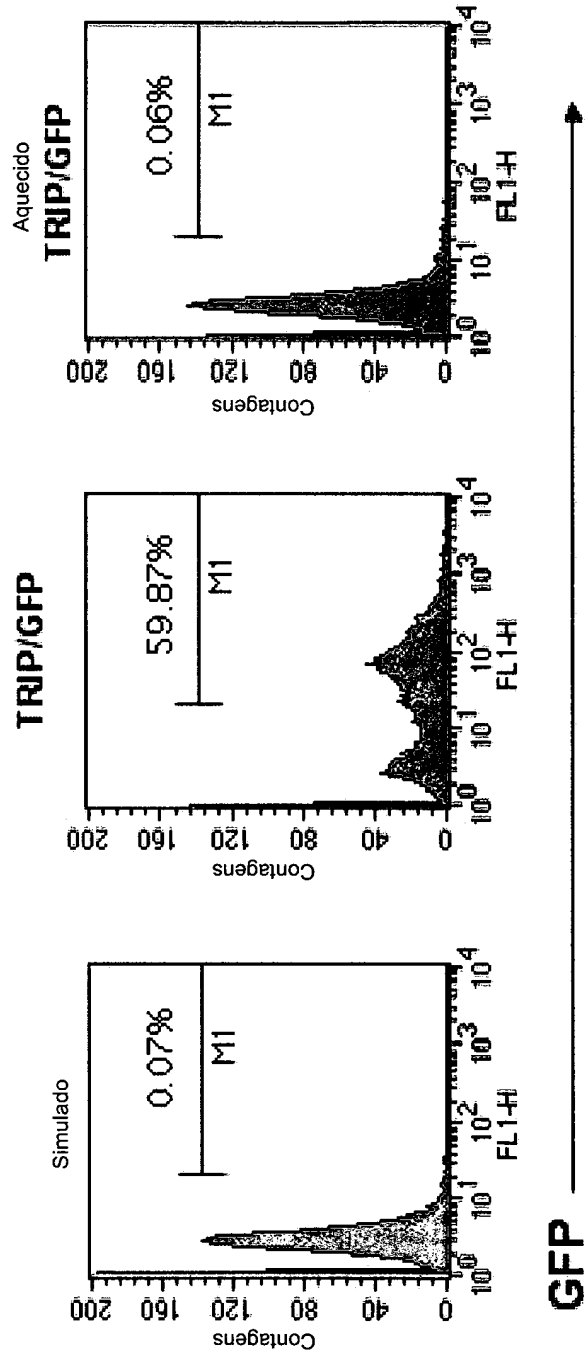


FIG. 3

atgagagttgtgtttgtcgtgctattgcttttgggtggccccagcttacagcttc
aactgccttggaatgagcaacagagacttcttggaggagtgtctggagcaaca
tgggtggatttgggttctcgaaggcgacagctgcgtgactatcatgtctaaggac
aagcctaccatcgatgtgaagatgatgaatatggaggcgggtcaacctggcagag
gtccgcagttattgctatttggctaccgtcagcgatctctccaccaaaagctgcg
tgcccgaccatgggagaagctcacaatgacaaaacgtgctgaccagcttttgtg
tgcagacaaggagtgggtggacagggctggggcaacggctgcggtattattggc
aaaggaagcattgacacatgcgccaaatttgctgctctaccaaggcaatagga
agaacctcttgaaagagaatatcaagtacgaagtggccatttttgtccatgga
ccaactactgtggagtcgcacggaaactactccacacaggttggagccactcag
gcagggagattcagcatcactcctgcggcgccttcatacacactaaagcttggg
aatatggagaggtgacagtggtgactgtgaaccacggtcagggattgacaccaat
gcatactacgtgatgactgttggaaacaagacggttcttgggtccatcgtgagtgg
tcatggacctcaacctcccttggagcagtgctggaagtactgtgtggaggaac
agagagacgttaatggagtttgaggaaccacacgccacgaagcagtcctgtgata
gcattgggctcacaagagggagctctgcatcaagcttggctggagccattcct
gtggaattttcaagcaacactgtcaagtgacgtcgggtcatttgaagtgtaga
gtgaagatggaaaaattgcagttgaaggaacaacctatggcgtctgttcaaag
gctttcaagtttcttgggactcccgcagacacaggtcacggcactgtggtgttg
gaattgcagtacactggcacggatggaccttgcaaagttcctatctcgtcagtg
gcttcattgaacgacctaacgccagtgggcagattgggtcactgtcaaccctttt
gtttcagtgggccacggccaacgctaaggtcctgattgaattggaaccaccctt
ggagactcatacatagtgggtgggcagaggagaacaacagatcaatcaccattgg
cacaagtctggaagcagcattggcaaagcctttacaaccacctcaaaggagcg
cagagactagccgctctaggagacacagcttgggactttggatcagttggaggg
gtgttcacctcagttgggaaggctgtctaa (SEQ ID NO: 9)

FIG. 4

agagttgtgtttgtcgtgctattgcttttgggtggccccagcttacagcttcaac
tgccttggaatgagcaacagagacttcttggaaggagtgtctggagcaacatgg
gtggatttgggttctcgaaggcgacagctgctgactatcatgtctaaggacaag
cctaccatcgatgtgaagatgatgaatatggaggcggcacaacctggcagaggtc
cgcagttattgctatttggctaccgtcagcgatctctccaccaaagctgctgctg
ccgaccatgggagaagctcacaatgacaaacgtgctgacctcagcttttgtgctg
agacaaggagtggaggacaggggctggggcaacggctgctgattatttggcaaa
ggaagcattgacacatgacgcaaatgtgctgctctaccaaggcaataggaaga
accatcttgaaagagaatatcaagtacgaagtggccatttttgtccatggacca
actactgtggagtgcacggaaactactccacacagggttgagccactcaggca
gggagattcagcatcactcctgctggcgcttcatacacactaaagcttgagaa
tatggagaggtgacagtggactgtgaaccacggctcagggttgacaccaatgca
tactacgtgatgactgttgaacaaagacgttcttgggtccatcgtgagtggctc
atggacctcaacctcccttggagcagtgctggaagtactgtgtggaggaaacaga
gagacgttaatggagtttgaggaaccacacgccacgaagcagctctgtgatagca
ttgggctcacaagagggagctctgcatcaagcttggctggagccattcctgtg
gaattttcaagcaacactgtcaagttgacgtcgggtcatttgaagtgtagagtg
aagatggaaaaattgcagttgaagggaaacaacctatggcgtctgttcaaaggct
ttcaagtttcttgggactcccgacagacacagggtcacggcactgtgggttggaa
ttgcagtacactggcacggatggaccttgcaaagttcctatctcgtcagtggct
tcattgaacgacctaacgccagtgggcagattgggtcactgtcaacccttttgtt
tcagtggccacggccaacgctaaggtcctgattgaattggaaccacctttgga
gactcatacatagtgggtgggagagggagaacaacagatcaatcaccattggcac
aagtctggaagcagcattggcaaagcctttacaaccacctcaaaggagcgcag
agactagccgctctaggagacacagcttgggacttgggatcagttggaggggtg
ttcacctcagttgggaaggctgct

(SEQ ID NO: 10)

FIG. 5

RVVFVVLLLLVA PAYSFNCLGMSNRDFLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIMSKDK
PTIDVKMMNMEAVNLAEVRSYCYLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRADPAFVC
RQGVVDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFACSTKAIGRTILKENIKYEVAIFVHGP
TTVESHGNYSTQVGATQAGRFSITPAAPSYTLKLGEYGEVTVDCEPRSGIDTNA
YYVMTVGTKTFLVHREWFMDLNL PWSSAGSTVWRNRETLMEFEEP HATKQSVIA
LGSQEGALHQALAGAI PVEFSSNTVKLTSGHLKCRVKMEKLQLKGT TYGVCSKA
FKFLGTPADTGHGTVVLELQYTGT DGPCCKVPISSVASLNDLTPVGR LVTVPFV
SVATANAKVLIELEPPFGDSYIVVGRGEQQIINHWHKSGSSIGKAFTTTLKGAQ
RLAALGDTAWDFG SVGGVFTSVGKAV (SEQ ID NO: 11)

FIG. 6

TTYGVCSKAFKFLGTPADTGHGTVVLELQYTGT DGPCCKVPISSVASLNDLTPVG
RLVTVPFVSVATANAKVLIELEPPFGDSYIVVGRGEQQI (SEQ ID NO:
12)

FIG. 7

PI.0617456-6

RESUMO

Patente de Invenção: "VACINA À BASE DE VETOR LENTIVIRAL".

5 A presente invenção refere-se a métodos para provocar respostas humorais, métodos de imunização e métodos de vacinação usando vetor lentiviral. Além disso, apresentam-se composições imunogênicas e vacinas para vírus do Nilo Ocidental.