

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: PI0304750-4 A2



Leia-me antes

(22) Data do Depósito: 31/10/2003

(30) Prioridade Unionista:	(33) País: HOLANDA	(31) Número: NL02079559-7	(32) Data: 01/11/2002
----------------------------	-----------------------	------------------------------	--------------------------

(51) Classificação: A61K 39/245 ; C12N 15/38 ; G01N 33/569

(54) Título: MUTANTE DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5, VACINA DIRIGIDA CONTRA A ENCEFALITE VIRAL BOVINA (BHV-5) E O VÍRUS RÁBICO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA VACINA

"MUTANTE DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5, VACINA DIRIGIDA CONTRA A ENCEFALITE VIRAL BOVINA (BHV-5) E O VÍRUS RÁBICO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA VACINA". É descrito um mutante de herpesvírus bovino tipo 5, uma vacina dirigida contra a encefalite viral bovina (bhv-5) e o vírus rábico e um método de preparação da dita vacina, sendo que o mutante de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) contém uma deleção funcional em cada um de pelo menos dois genes relacionados a manifestações clínicas de neurovirulência após a infecção de um hospedeiro com BHV-5. Além disto, a invenção fornece uma vacina que compreende tal mutante. A invenção ainda fornece um método para distinguir um ruminante infectado com uma amostra selvagem de BHV-5 ou vacinado contra BHV-5 em uma população de ruminantes vacinados com uma vacina de acordo com a invenção compreendendo o teste de um ruminante para a presença ou ausência de anticorpos dirigidos contra a glicoproteína I (gI), a glicoproteína E (gE) ou ambas.

(71) Nome do Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Nome do Inventor: Paulo Michel Roehe / [Ana Claudia Franco](#)  / Franciscus Antonius Maria Rijsewijk

**MUTANTE DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5, VACINA DIRIGIDA
CONTRA A ENCEFALITE VIRAL BOVINA (BHV-5) E O VÍRUS
RÁBICO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA VACINA**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção diz respeito a um mutante de herpesvírus bovino tipo 5, vacina dirigida contra a encefalite viral bovina (BHV-5) e o vírus rábico e método de preparação da vacina. Mais especificamente um mutante de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) que contém uma deleção funcional em cada um de pelo menos dois genes relacionados a
10 manifestações clínicas de neurovirulência após a infecção de um hospedeiro com BHV-5.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), também conhecido como herpesvírus encefalítico bovino, é um dos agentes etiológicos de
15 encefalites fatais em bovinos e outros ruminantes. O BHV-5 é um alfa herpesvírus e possui um genoma de fita dupla de DNA, contendo aproximadamente 140.000 pares de bases, cuja seqüência é pouco conhecida. O BHV-5 é encontrado em gado principalmente no Hemisfério Sul, como por exemplo na Austrália, Brasil e Argentina, mas
20 casos esporádicos na América do Norte e Europa já foram relatados. Até o presente momento, não há vacinas disponíveis contra o BHV-5 seguras e eficazes. A proteção cruzada por vacinação contra BHV-1 parece ocorrer para amostras pouco virulentas de BHV-5, mas parece ser insuficiente para conferir proteção contra amostras de BHV-5 mais
25 virulentas. Vários genes foram indicados como possíveis responsáveis pela neurovirulência do BHV-5 em animais experimentais. Por exemplo, o gene da glicoproteína E [Chowdhury et al., (2000) Bovine herpesvírus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence

in the olfactory pathway of the rabbit. J Virol. 74:2094-2106]; o gene US9 [Chowdhury et al., (2002) Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) US9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. J Virol. 76:3839-3851] e o gene da glicoproteína C [Chowdhury et al., (2000) Neurovirulence of glycoprotein C (gC) deleted bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. J Neurovirol. 6:284-295]. Entretanto, possíveis relações e contribuições destes genes ao desenvolvimento e curso de uma encefalite viral induzida pelo BHV-5 em ruminantes não são ainda conhecidas. Na América Latina, infecções pelo BHV-5 são até mesmo vistas como a segunda principal causa de encefalites virais em bovinos, seguindo a encefalite viral causada pelo vírus rábico. A transmissão do BHV-5 não foi ainda associada a morcegos hematófagos. Como muitas outras infecções por herpesvírus, o vírus é usualmente transmitido através de contato direto ou indireto. O principal reservatório de vírus identificado até o momento é a espécie bovina, embora um papel para ovinos não possa ser excluído, já que este vírus pode infectar esta espécie experimentalmente.

Como dito antes, outra causa de encefalite viral em ruminantes é o vírus da raiva. Os vírus rábicos (VR) são membros do gênero *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. No momento sete genótipos foram identificados entre os lissavírus [Bourhy et al. (1993) Molecular diversity of the Lyssavirus genus. Virology. 194:70-81; Gould et al. (1998) Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Austrália. Virus Res. 54:165-187], mas também entre estes genótipos diferentes grupos são encontrados. Cada grupo está associado com diferentes espécies. Por exemplo, vírus da raiva “clássica” estão classificados no genótipo I, junto com vírus rábicos pertencentes ao grupo de lyssavírus de quirópteros, os quais são

encontrados entre os morcegos americanos. Estes morcegos são insetívoros, frugívoros ou hematófagos. Os lyssavírus de quirópteros do genótipo I, encontrados em morcegos hematófagos, causam encefalite fatal em ruminantes e cavalos, especialmente em terneiros [Favoreto et al. (2002) Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. Rev Inst Med Trop São Paulo. 44:91-95]. O genoma dos vírus rábicos são compostos de RNA senso negativo, não segmentado, de aproximadamente 12 kb. Ele codifica pelo menos cinco proteínas identificadas: nucleoproteína 'N'; fosfoproteína 'P', também chamada 'M' ou 'NS'; proteína da matriz 'M'; glicoproteína G e proteína grande 'L' [Tordo et al. (1988) Completion of the rabies virus genome sequence determination: Highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative strand RNA viruses. Virology 165:565-576]. Embora o número de casos de raiva em cães, gatos e humanos no Brasil tenha diminuído no último decênio, o número de casos de raiva em rebanhos de bovinos, transmitido pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*, aumentou durante este período [Favoreto et al. (2002) Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. Rev Inst Med Trop São Paulo. 44:91-95]. Foi estimado que, somente no Brasil, por volta de 30.000 bovinos são perdidos por ano devido à raiva transmitida por morcegos. O número de bovinos infectados por raiva a cada ano em toda a América Latina deve ser representativo deste número.

A raiva em bovinos é do tipo parálitica, porque sinais clínicos de paralisia são os mais característicos da infecção. Bovinos são infectados por mordidas de morcegos hematófagos durante o repasto, seguido da infecção do sistema nervoso central e, eventualmente, resultando na morte dos animais devido a uma encefalite fatal. Além das perdas

econômicas, bovinos infectados com raiva podem ser uma fonte de infecção para humanos.

Assim, considerando que a encefalite viral, devido à raiva transmitida por morcego e devido à BHV-5, é um problema crescente
5 entre ruminantes, especialmente bovinos, principalmente na América do Sul, que as vacinas anti-rábicas presentemente usadas em bovinos falham em conferir proteção suficiente contra raiva transmitida por morcegos, que a vacina contra BHV-5 não está disponível, e que a sugerida proteção cruzada por BHV-1 não é suficiente para as amostras
10 mais virulentas de BHV-5, a presente invenção fornece uma vacina contra a raiva transmitida por morcegos para proteger ruminantes contra doenças induzidas pela raiva dos morcegos e contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), mais especificamente contra doenças de bovinos causadas por BHV-5, preferentemente contra encefalite viral.

15 **SUMÁRIO**

De um modo geral, a presente invenção diz respeito a um mutante de herpesvírus bovino tipo 5, uma vacina dirigida contra a encefalite viral bovina (BHV-5) e o vírus rábico e um método de preparação da vacina que compreende um mutante de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) que
20 contém uma deleção funcional em cada um dos genes relacionados a manifestações clínicas de neurovirulência após uma infecção de um hospedeiro pelo BHV-5.

A invenção fornece um mutante de herpesvírus tipo 5 (BHV-5) que alberga uma deleção em cada um de no mínimo dois genes
25 relacionados a manifestações clínicas de neurovirulência após a infecção de um hospedeiro com BHV-5. Tal mutante pode ser um mutante que ocorre naturalmente, chamado mutante espontâneo, o qual é isolado de acordo com um protocolo descrito na presente invenção, ou

pode ser um mutante obtido a partir de técnicas recombinantes, conforme descrito a seguir.

É característica da presente invenção a construção de um mutante que contém uma deleção funcional em cada um de pelo menos três genes relacionados à manifestação clínica de neurovirulência após a infecção de um hospedeiro com BHV-5. É preferível que um gene compreenda o gene da glicoproteína I (gI), gene da glicoproteína E (gE) e gene da US9, mas é por exemplo suficiente para deletar totalmente o gene gE e promover deleções funcionais na região C terminal do gene gI e na região N terminal da US9.

Embora seja preferível que as deleções causem uma completa falta de expressão do polipeptídeo codificado por pelo menos um ou mais dos genes relacionados à manifestação clínica de neurovirulência após a infecção de um hospedeiro com o BHV-5 durante a replicação do dito mutante em um hospedeiro, para uma deleção funcional é suficiente promover uma deleção que impeça a expressão desta, ou que forneça para tal uma proteína truncada ou alterada de outra forma (por exemplo a deleção ou inserção de um, dois, quatro, cinco ou mais [mas não uma múltiplos de três] nucleotídeos) por troca de fase de leitura e logo por tradução de uma fase de leitura inapropriada), tanto que a proteína resultante não possa mais realizar a sua interação com o hospedeiro.

A invenção também fornece um mutante útil como uma vacina diferencial, na qual é preferível que haja uma completa falta da expressão do dito polipeptídeo durante a replicação do dito mutante num hospedeiro, permitindo o teste do dito hospedeiro e determinação se o hospedeiro foi infectado com um segundo BHV-5 capaz de expressar o dito polipeptídeo. Isto é particularmente útil quando se quer discriminar animais infectados com BHV-5 selvagem de animais vacinados com um

mutante vacinal como descrito na presente invenção. Tal teste preferencialmente compreende a determinação da presença ou ausência de um anticorpo especificamente direcionado contra o dito polipeptídeo no dito hospedeiro. É preferível que o polipeptídeo
5 marcador compreenda a gE, gI ou ambos.

É característica adicional da invenção fornecer um mutante de BHV-5 útil como um vetor vacinal, tal mutante contendo adicionalmente um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo derivado de um patógeno diferente do BHV-5. Tal patógeno pode ser um microorganismo, tal
10 como uma bactéria ou protozoário, mas preferencialmente é um vírus.

No formato preferencial, a invenção fornece um mutante que compreende um gene sintético que codifica a proteína G do vírus da raiva de morcego. Na descrição detalhada, a proteína G de um vírus rábico pertencente aos lyssavírus quirópteros isolados de bovinos e
15 pertencentes ao tipo encontrado no morcego *Desmodus rotundus*, sendo esta a proteína G mais relevante antigenicamente na América Latina. Isto se refere a um mutante de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) com uma tripla deleção do gene da glicoproteína I (gI), gene da glicoproteína E (gE), e do gene da US9, baseado numa amostra de
20 BHV-5 da América do Sul. Sendo assim, a invenção fornece um vetor vacinal que compreende um recombinante BHV-5/raiva contendo a proteína do gene G sintético expressa no local da deleção da gI, gE e US9.

A invenção fornece uma vacina contra a encefalite viral bovina ou
25 herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), assim como raiva. Como dito, tal vacina é preferencialmente baseada no gene G sintético a partir da raiva transmitida por morcego, expressa por um mutante triplo deletado de um herpesvírus bovino tipo 5.

A invenção fornece um método de imunizar os hospedeiro ruminante contra a raiva de morcego e a doença causada por BHV-5, particularmente contra a encefalite viral.

Adicionalmente, a invenção fornece um método para distinguir um
5 ruminante infectado com uma amostra de BHV-5 selvagem ou vacinado contra BHV-5 em uma população de ruminantes vacinados com a vacina objeto da presente invenção, dito método que compreende testar ruminantes para a presença ou ausência de anticorpos direcionados contra a glicoproteína I (gI) ou a glicoproteína E (gE) ou ambas.

10 A invenção também fornece um método para preparar a vacina direcionada contra a encefalite viral em ruminantes, compreendendo o preparo do mutante, conforme descrito na presente invenção, com o adequado carreador ou diluente, e o método para preparação da vacina com duplo propósito direcionada contra a encefalite viral em ruminantes
15 e direcionada contra a doença causada por outro patógeno compreendendo a preparação de um mutante com o adequado carreador ou diluente. É preferível que a dita vacina seja vacina viva modificada.

A invenção também fornece um kit de teste para executar o método
20 que distingue um ruminante infectado com uma amostra de BHV-5 selvagem ou vacinado contra BHV-5 na população de ruminantes vacinados com a vacina descrita na presente invenção, dito método que compreende o teste de ruminantes para a presença ou ausência de anticorpos direcionados contra a glicoproteína I (gI) ou glicoproteína E
25 (gE) ou ambas.

A presente invenção fornece uma vacina específica contra a raiva transmitida por morcego e contra BHV-5 para bovinos, resultando em

uma ferramenta para reduzir encefalite viral bovina e diminuir os custos para os produtores.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1** apresenta a seqüência de 1598 nucleotídeos ao longo da seqüência do fragmento sintético de DNA (RGRESM que codifica a proteína G encontrado no isolado rábico (GUY 1-BV) na Guiana Francesa em 1985 de um bovino infectado por uma variante de raiva originária de *Desmodus rotundus*.

O fragmento sintético de DNA RGRESM codificando esta proteína G da raiva de morcego é fita dupla mas nesta figura apenas a fita codificante da proteína é fornecida. A seqüência de nucleotídeo; é traduzida de acordo com o código universal e os aminoácidos codificados estão indicados em códigos de três letras embaixo da seqüência de nucleotídeos.

15 A **Figura 2** apresenta a estrutura do plasmídeo pBC-RGRESM.

A **Figura 3** apresenta um diagrama da estrutura do genoma do BHV-5 e organização genômica dos genes na região de recombinação. O BHV-5 selvagem possui cerca de 140 kilo pares de base (kpb) de tamanho, possuindo uma região única longa (UL) e uma região única curta (UC). A região única curta é cercada por regiões repetidas invertidas indicadas por caixas hachureadas (IR= Região Repetida Interna; TR= Região Repetida Terminal). É apresentado um mapa da região única curta da amostra selvagem EVI-88 (amostra de BHV-5 isolada no Brasil em 1995) com mais detalhes sobre a amostra selvagem (EVI-88). A região indicada é um fragmento Bam HI de 16.4 kpb, no qual os genes estão indicados segundo a glicoproteína D (gD), glicoproteína I (gI) e glicoproteína E (gE) e o gene US9. A região que codifica as proteínas relativas a estes genes está apresentada por

caixas indicadas com seus respectivos nomes. As flechas entre estas caixas indicam a direção da transcrição destes genes. Na região 3' do gene US9 foi encontrada uma duplicação parcial do gene US 1.67 (US 1.67). Próximo ao sítio reconhecido pela enzima de restrição Bam HI, o sítio para a enzima de restrição Eco NI é também indicado.

A **Figura 4** apresenta um diagrama da clonagem e sub clonagem da região US do BHV-5 com o objetivo de construir um fragmento recombinante que delete os genes gl/gE e US9 e substitua estes genes por um cassete de expressão para a proteína do gene G da raiva de morcegos. No topo é indicado o plasmídeo pAC 41 que carrega o fragmento Bam HI 16.4 kpb da amostra de /BHV-5 EVI-88 clonado dentro do sítio de Bam HI do pBR322. Além do sítio de Bam HI, o sítio para Eco NI está indicado juntamente com os genes codificando para gD, gl, gE e US9.

O fragmento Eco NI de 5.8 kb do clone pAC 41 codificando os genes gD, gl e gE foi então subclonado dentro do sítio "blunt" do plasmídeo pCR-Blunt, resultando no plasmídeo pAC 104 e o fragmento de 3.6 kb EcoNI-Bam HI/Eco NI foi então sub clonado dentro do sítio "blunt" de pCR-Blunt resultando no plasmídeo pAC 102. Parte US1.67 é uma seqüência parcial do gene US1.67. TR= Terminal Repeat.

A **Figura 5** apresenta o diagrama da sub clonagem dos fragmentos de recombinação 5'e 3' do BHV-5 gl/gE/US9 deletado. Do fragmento NruI de 1.8 kb do pAC 104 codificando a porção C-terminal da glicoproteína gG (partG) e a completa glicoproteína D (gD) foi clonada dentro do sítio "blunt" de pCR-Blunt, resultando no plasmídeo pAC 106. O fragmento de 1.6 kb Not I do pAC 102 foi sub clonado dentro do sítio de Not I na forma circular do pCR-Blunt, resultando no plasmídeo pAC 112. Os sítios Nru I e Not I são indicados. Os genes de BHV-5 são indicados como

explicados na legenda da Figura 3. Os dois fragmentos de BHV-5 foram clonados dentro do seu respectivo vetor na orientação que é indicada no diagrama. TR= (parte da) Repetição terminal.

A **Figura 6** é uma representação da construção do fragmento de deleção do BHV-5 gI/gE e US9. O fragmento de 1.8 kb Nru I foi liberado do plasmídeo pAC 106 utilizando a enzima de restrição Eco RI que corta no vetor pCR-Blunt próximo ao sítio de inserção (menos que 10 pb de cada lado). O fragmento de 1.8 kb Nru I foi clonado juntamente com as extremidades Eco RI do vetor pCR-Blunt foi clonado dentro do sítio de Eco RI do pAC 112 que foi formado depois da digestão de pAC 112 com Eco RI (esta remoção da região de clonagem com extremidades “blunt” entre os sítios de Eco RI, mas deixando a vizinhança do fragmento de 1.6 kb Not I intacto).

O clone com o fragmento Nru I na mesma orientação com respeito ao fragmento Not I como no genoma de BHV-5 como descrito no diagrama foi chamado pAC 226. O fragmento de 3.4 kb Nru I/Not I construído no pAC 226 pode ser utilizado para recombinar com o genoma do BHV-5 selvagem para propagar a deleção gI/gE/US9.

A **Figura 7** é uma representação da construção do cassete de expressão hCMVie 1 para expressar a proteína G do vírus da raiva de morcego. O fragmento de DNA de 1590 pb que é retirado do plasmídeo pBC-RGRESM pela enzima de restrição Stu I foi clonado dentro do sítio de Eco RV do vetor de expressão eucariótico pVR1012 em tal orientação que a região N-terminal está ao lado do promotor e a região C-terminal está ao lado da seqüência BT. O promotor em pVR102 é a região promotora/reguladora do citomegalovírus humano IE1 (hCMV IE1p) que é seguido pela região 5' não traduzida (hCMVIE 5'UT). Na

região 3'do sítio de inserção do pVR1012 fica a seqüência terminadora do hormônio de crescimento bovino (BT).

A **Figura 8** é uma representação da clonagem do cassete de expressão do hCMVie1 contendo a proteína G da raiva de morcego dentro do fragmento de deleção/recombinação de 3,4 kb do BHV-5. O cassete de expressão hCMVie1 contendo o fragmento de DNA de 1598 pares de base codificando a proteína g da raiva de morcego foi retirado do plasmídeo pVR1012/RGRESM usando enzimas de restrição MscI e Acc65I.

O fragmento MscI/Acc65I tem 3,6 kb (a escala deste 3,6 kb é 5 vezes a escala do fragmento de deleção/recombinação de BHV-5 de 3,4 NruI/NotI). O sítio Acc65I foi feito blunt e o fragmento MscI/Acc65I de 3,6 kb foi clonado dentro do sítio de EcoRV de pAC226. O cassete de expressão da raiva de morcego teve no plasmídeo resultante a mesma orientação de transcrição que o gene gD e os genes originais gI/gE/US9, como indicado pelas setas entre o gene gD e o gene G da raiva de morcego.

A **Figura 9** apresenta um esquema do vetor de expressão nomeado BHV5-hCMV-RGRESM resultante de BHV-5 –gI-/gE-/US9-proteína G da raiva de morcego.

O topo da figura indica a estrutura total de aproximadamente 140 kb do genoma do BHV-5 que consiste em uma região única longa (UL) e uma única curta (US). A região US é flanqueada por regiões invertidas repetidas indicadas por caixas hachureadas (IR= Repetição Interna, TR= Repetição Terminal).

O esquema do centro apresenta a região US do BHV-5 após a deleção de 4 kb compreendendo os genes gI/gE e US9, resultando em um fragmento Bam HI de 12.4 kb. Entre o gene gD e o gene parcial

US1.67, no sítio de Eco RV originário de pAC226, foi inserido o cassete de expressão da proteína G da raiva de morcego hCMV.

O fundo indica o fragmento de 3.6 kb que carrega o cassete de expressão da proteína G da raiva de morcego como foi inserido no
5 genoma do BHV-5 no local da deleção gl/gE/US9.

A **Figura 10** representa a árvore filogenética baseada em alinhamento através do método Clustal V de seqüências de aminoácidos de três seqüências da proteína G de vírus da raiva de morcego e três seqüências da proteína G de amostras de vacinas “clássicas” da raiva.
10 As seqüências do vírus da raiva de morcego são de um isolado argentino ARG1-BT (NCBI número de acesso AF325493), um isolado brasileiro BRA1-BV (NCBI número de acesso AF325431) e a seqüência G da raiva de morcego, conforme apresentada no presente relatório descritivo. As seqüências de vírus clássicos vacinais são da amostra
15 ERA, amostra PV e amostra de raiva japonesa RC-HL (com respectivo número de acesso no NCBI GI95265, GI333585 e AB009663). A árvore apresenta seqüências do G do vírus da raiva formando dois grupos distintos, sendo o primeiro composto por amostras “clássicas” do vírus rábico (amostras ERA, PV e RC-HL) isoladas de cães, e o segundo por
20 amostras isoladas de morcegos (ARG-1 BV e BRA1-BV).

A **Figura 11** é uma representação gráfica da excreção de vírus BHV-5 por secreção nasal em terneiros infectados com BHV-5 (EVI88/95) (linha azul) e com o vírus recombinante BHV-5 gl/gE/US9 (laranja) após a infecção primária. Os títulos virais estão expressos em
25 Log₁₀ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀).

A **Figura 12** é uma representação gráfica dos títulos médios de anticorpos neutralizantes (expressos em log₂/50 ul) em animais

infectados com o BHV-5 (EVI 88/95), BHV-5 (verde) e com o BHV-5 gl/gE/US9-).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Construção de um gene sintético codificando a desejável proteína

5 G da raiva de morcegos

A escolha da seqüência de aminoácidos da proteína G do vírus da raiva de morcego desejável para ser utilizada em uma vacina visando a proteger contra a raiva transmitida por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e um número de seqüências da proteína G de vírus da raiva de morcego isolados recentes foram comparados. Estes incluem o isolado argentino ARG1-BT (número de acesso AF325493) isolado de morcego na Argentina em 1991, isolado brasileiro BRA2-BV (número de acesso AF325491) isolado de bovino no Brasil em 1996, isolado mexicano MEX2-BT (número de acesso AF325492) isolado de um morcego no México em 1987 e Guy1-BV (número de acesso AF325490) isolado de bovino na guiana francesa em 1985. Todas as 4 seqüências da proteína G foram alinhadas entre si com o isolado francês FRA1-FX (número de acesso AF325461) isolado de uma raposa em 1991, utilizando o programa de análise de seqüências DNASTAR/ClustalW. Esta análise demonstrou que todas as 4 seqüências de proteínas G de morcego foram agrupadas juntas, excluindo o isolado francês de raposa. Os isolados BRA2-BV e GUY1-BV podem ambos ser utilizados como seqüência inicial para o gene sintético, sendo ambos os isolados de bovino, tendo ambos o morcego *Desmodus rotundus* como hospedeiro da amostra.

Contudo, a seqüência do isolado BRA2-BV apresenta algumas substituições aberrantes entre os aminoácidos 470 e 500. Além disto, a seqüência da proteína G do isolado GUY1-BV, foi tomada como ponto

de partida para a construção da seqüência sintética do gene G de raiva de morcego. Como o mRNA do vírus da raiva não é normalmente presente no núcleo das células infectadas, a região codificante do G da raiva de GUY1-BV teve que ser pesquisado para a presença de uma
5 região sinal do tipo comum ou U2 para processamento (Sharpe & Burge 1997 *Classification of introns: U2 type or U12 type*, Cell 91, 875-879).

Utilizando o programa de análise de seqüências PC-gene para detecção de sinais para processamento de introns de RNA, foram encontrados 12 sítios doadores e 5 sítios receptores de sinais de
10 processamento que tiveram um valor mais alto do que ponto de corte do programa.

Estes sinais de processamento, quando expressos pelo BHV-5 no núcleo, podem ser reconhecidos e processados por proteossomos tipo U2. Contudo, a seqüência foi adaptada de tal forma que todos os sinais
15 significantes de processamento, mas também um grande número de sinais de processamento que baixam o ponto de corte, foram removidos enquanto o potencial codificante não foi afetado [Kuhnle et al. (1998) A proteína de membrana G de classe II do vírus respiratório sincicial bovino expresso a partir de um gene sintético, é incorporado dentro dos
20 vírions do herpesvírus bovino 1 recombinante. J.Virol. 72:3804-11].

A seqüência adaptada de nucleotídeos foi construída desse tal forma que a seqüência de DNA resultante codifica para os mesmos aminoácidos que a seqüência da proteína G original da amostra GUY1-BV, com exceção do resíduo de aminoácido número 352. Este
25 aminoácido, que era na seqüência original um resíduo de arginina (Arg), foi substituído por um resíduo de glutamina (Glu). Esta substituição do resíduo 352, ou do resíduo 333 da proteína madura após a remoção do peptídeo sinal, reduz a virulência da proteína G [(Tuffereau et al. (1989)]

Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172:206-12; Benejean et al. (1998) Avirulent anti rabies vaccine. US patent US5853735 dated 1998-12-29].

5 Para estimular a tradução da proteína G de morcego codificada, a região de consenso, seqüência Kozak (GCCGCCACC), foi adicionada na região 5' da seqüência codificante imediatamente antes do códon inicial ATG. [M. Kozak (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eucaryotic
10 ribossomes. *Cell* 44:283-92].

No final da região codificante da proteína foi inserido um "STOP" códon após a região final carboxiterminal da proteína G. Para permitir a remoção da seqüência construída na forma de um fragmento de pontas cegas a partir de um vetor, a seqüência reconhecida pela
15 enzima *StuI* foi adicionada a ambos os lados da seqüência desenhada fazendo com que o total de nucleotídeos seja de 1598, conforme apresentado na Figura 1.

A Figura 1 anexa apresenta a seqüência de 1598 nucleotídeos ao longo da seqüência do fragmento sintético de DNA (RGRESM que
20 codifica a proteína G encontrado no isolado rábico (GUY 1-BV) na Guiana Francesa em 1985 de um bovino infectado por uma variante de raiva originária de *Desmodus rotundus*. Esta seqüência de aminoácidos é idêntica (com uma exceção) à seqüência traduzida recuperada da base de dados do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia,
25 número de acesso AF325490. Esta seqüência foi submetida em 01/12/2000 pelo departamento de virologia do Laboratório de Lyssavirus, Instituto Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, Paris Cedex 1575724 e foi também mencionada na publicação de H. Badrane e N.

Tordo (2001) Host switching in Lyssavirus History from the Chiroptera to the Carnívora Orders. J. Virol. 75(17, 8096-8104). A única exceção é o aminoácido no resíduo número 352. Este aminoácido, que era na seqüência de aminoácido original um resíduo de arginina (ARG) foi substituído por um resíduo de glutamina (GLU). Este resíduo de aa substituído está indicado em negrito e por uma estrela (*). A seqüência de aminoácidos;é quase idêntica a seqüência do GUY1-BV mencionada acima, a seqüência de nucleotídeo está, contudo, modificada em vários lugares (aproximadamente 10%). Estas mudanças de nucleotídeos foram introduzidas para remover os tipos comum ou U2 de sinais de processamento (Sharpe & Burge 1997 Clasification of introns:U2-type or U12 type, Cell, 91, 875-879). A região que codifica o codon de iniciação desta proteína G da raiva de morcego está apontada por um N com uma flecha, indicando região N terminal desta proteína G do vírus da raiva de morcego. O último códon (CTC) está apontado por uma flecha e um C, indicando a região C terminal desta proteína G.

O último códon é seguido pelo códon de terminação (TGA) e este códon é indicado através da palavra "STOP". Na região 5'ao códon de iniciação (ATG) foi insertada uma seqüência consenso tipo Kozak, indicada em negrito. Em ambos os lados do fragmento de DNA a seqüência reconhecida como sítio de restrição da enzima Stu I foi adicionada, permitindo a utilização da enzima de restrição Stu I para retirar a seqüência do gene G do vírus da raiva de morcego juntamente com a seqüência consenso Kozak e o STOP códon fora do vetor de clonagem (p.ex. pGEM-T-easy).

Usando técnicas padrão de síntese de DNA um fragmento de fita dupla de DNA com 1598 nucleotídeos foi sintetizado a partir da seqüência desenhada, clonado em um plasmídeo procariótico pGEM-T

easy e propagado em *Escherichia coli*, conforme apresentado na Figura 2.

Através da digestão do plasmídeo pBC-RGRESM com a enzima de restrição Stu I foi liberado um fragmento compreendendo 1590 pb que codifica a proteína G do vírus da raiva de morcegos, cuja seqüência de aminoácidos é fornecida na Figura 1. Este fragmento contendo 1590 pb foi inserido dentro do cassete de expressão do plasmídeo pVR1012.

Clonagem da região Única Curta da amostra EVI-88 do herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5).

O herpesvírus bovino tipo 5 é altamente neurovirulento para bovinos, com conseqüências fatais. Para desenvolver um vetor BHV-5 que seja suficientemente eficaz como uma vacina, a amostra Sul Americana de BHV5 EVI88, isolada no Rio Grande do Sul no Brasil em 1995, foi utilizada como a amostra parental. Esta amostra foi utilizada no lugar de outras amostras isoladas em outros continentes como Austrália por causa de possíveis diferenças antigênicas. Quando analisada por enzimas de restrição, a amostra EVI88 é representativa da maioria dos isolados identificados na América do Sul até o momento. Para construir um vetor BHV-5, que é suficientemente atenuado, genes que foram identificados como importantes para a neurovirulência do BHV-5 foram deletados do genoma da amostra EVI88 de BHV-5. Assim, o gene que codifica a glicoproteína E (gE) foi identificado como importante para a neuroinvasividade e neurovirulência nas vias olfatórias [Chowdhury et al. (2000) Bovine herpesvírus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactoiry pathway of the rabbit. J Virol. 74:2094-2106] e foi então deletado. O gene que codifica a US9 do BHV-5 foi também implicado na neurovirulência por causa do seu papel no transporte de glicoproteínas através dos axônios

[Chowdhury et al. (2002) Bovine herpesvírus 5 (BHV-5) US9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. J Virol. 76:3839-3851] e foi também deletado.

Para atenuar ainda mais a amostra de BHV-5 EVI 88, o gene que
5 codifica a glicoproteína I (gI) foi também deletado. As glicoproteínas I e
E (gI e gE) formam um complexo funciona, e logo podem ter o mesmo
papel nos mecanismos de disseminação célula-célula do BHV-5.
Entretanto, a gI pode ter funções extras, porque a infecção de um vírus
com uma deleção dupla da gI/gE do BHV-1 foi mais atenuado do que
10 um mutante com deleções únicas da gI e gE [Kaashoek et al. (1998)
Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvírus 1
mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE or in both the gI and gE
gene. Vaccine. 16:802-809]. O sítio de deleção da gI/gE/US9 é também
utilizado para inserir o cassete de expressão do gene G do vírus rábico
15 de morcegos.

Era esperado que todos os três genes estivessem localizados perto
um do outro em um lado da região Única Curta do genoma do BHV-5.
Para criar este tripla deleção a partir da amostra EVI88 de BHV-5, o
fragmento Bam HI de 16,4 kilo pares de bases (kb), que cobre
20 completamente a região Única Curta do BHV-5 [Engels et al. (1986) *The
genome of bovine herpesvírus 1 (BHV-1) strains exhibiting a
neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by
restriction site mapping and cross hybridization. Virus Res. 6:57-73;*
Bulach & Studdert (1990) Comparative genome mapping of bovine
encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus.
25 Arch. Virol. 113:17-34] foi clonada no pBR322, conforme apresentado na
Figura 3.

Localização das possíveis posições dos genes da gG, gD, gI, gE e US9 no fragmento BamHI de 16,4 kb do EVI-88.

Para construir um fragmento recombinante que permitisse ao mesmo tempo a deleção dos genes gI/gE/US9 e a substituição pelo
5 cassete de expressão da proteína G do vírus rábico de morcego, as possíveis posições dos genes gI, gE e US9 da amostra EVI 88 de BHV-5 foram identificadas dentro do fragmento BamHI de 16,4 kb. Baseado em dados publicados sobre a localização da gG do BHV-5 (também chamada US4) [Engelhardt & Keil (1996) Identification and
10 characterization of the bovine herpesvírus 5 US4 gene and gene products. Virology 225:126-135. NCBI accession number X99755] e da gD do BHV-5 [Abdelmagid et al. (1995) Fine mapping of bovine herpesvírus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5
15 gD. Virology 206:242-253, NCBI accession number U14656], foi inferido que o sítio para EcoNI que Engelhardt e Keil (1996) encontraram no meio do gene gG da amostra N569 do BHV-5 era conservada na amostra EVI88 e que o gene gD estava localizado na porção à esquerda do fragmento EcoNI de 5,8 kb do meio do fragmento de 16,4 kb BamHI
20 do genoma da amostra EVI88, de acordo com o apresentado na Figura 3. Para identificar as posições dos genes gE e US9 dentro do fragmento BamHI de 16,4 kb do EVI88, os dados das seqüência publicada de Chowdhury et al. (2000 e 2002) foram utilizados [Chowdhury et al. (2000) Bovine herpesvírus 5 glycoprotein E is important for
25 neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit J. Virol. 76 (8), 3839-3851, NCBI accession number AY064172].

Subclonagem da região que contém a gD, gI, gE e US9 na amostra de BHV-5 EVI88

Para continuar caracterizando o mapa físico da região Única Curta da amostra EVI88 de BHV-5 e para ter subclones adequados para construir um fragmento de deleção para a região da gl/gE/US9, dois subclones foram construídos a partir do fragmento Bam HI de 16,4 kb clonado no clone pAC41. Primeiro o pAC41 foi clivado com a EcoNI, liberando um fragmento EcoNI-BamHI/EcoNI de 3,6 kb, por causa de um sítio de EcoNI localizado no vetor pBR322 próximo ao sítio de BamHI no qual o fragmento de 16,4 kb foi clonado, de acordo com a Figura 4. Este fragmento EcoNI foi feito blunt usando a enzima Kew polymerase e foi ligado ao pCR-Blunt utilizando métodos padrão. O clone resultante foi chamado pAC102. A mesma clivagem do pAC41 com EcoNI também liberou um fragmento EcoNI de 5,8 kb originado do meio do fragmento Bam HI de 16,4 kb. Este fragmento EcoNI de 5,8 kb foi também feito blunt e clonado dentro do pCR-Blunt utilizando-se técnicas padrão. O clone resultante foi chamado pAC104. Ambos os clones foram utilizados para realizar mais análises com enzimas de restrição para localizar as possíveis posições dos genes nesta região da amostra de BHV-5 EVI88.

Construção do fragmento de deleção/recombinação para o loci da gl/gE/US9 do BHV-5

Para construir um fragmento de deleção que possa ser utilizado para deletar a região da gl/gE/US9 do genoma da amostra EVI88 de BHV-5, ambos os fragmentos em frente e atrás da região deletada tiveram que ser clonados. Ambos os fragmentos deveriam ter pelo menos 1 kb de comprimento para permitir a recombinação com o genoma do vírus selvagem a ambos os fragmentos deveriam flanquear o sítio pretendido da deleção. O fragmento à frente que foi escolhido foi o fragmento Nrul de 1,8 kb que começa 149 nucleotídeos antes do final da região codificante da gG, cobre toda a região que codifica a gD e

termina no início da região que codifica a gl. Veja Figura 5. O fragmento de trás que foi escolhido foi o fragmento NotI de 1,6 kb que inicia no final da região codificante da US9, cobre o gene parcial da US1.67 e termina na região repetida terminal. Ambos os fragmentos foram clonados dentro do pCR-Blunt utilizando-se os métodos usuais. O sítio de NruI, que é blunt, foi clonado no sítio blunt do pCR-Blunt, resultando no clone pAC106 e o fragmento NotI de 1,6 kb foi clonado no sítio para NotI de um pCR-Blunt clonado e digerido com NotI. O clone resultante foi chamado pAC112. Para construir um fragmento de deleção/recombinação para deletar os genes gl/gE/US9 da amostra EVI88 de BHV-5, ambos os fragmentos anterior e posterior foram clonados ao lado um do outro na mesma orientação do fragmento original BamHI de 16,4 kb da região Única Curta. Para isto, o fragmento NruI de 1,8 kb foi liberado do clone pAC106 usando os sítios da enzima EcoRI que flanqueiam o sítio de inserção do pCR-Blunt. Veja Figura 6. Este fragmento EcoRI/NruI-NruI/EcoRI foi clonado no sítio de EcoRI do clone pAC112 próximo ao sítio para NotI que contém o fragmento posterior à deleção. O clone resultante foi chamado pAC226 e contém ambos os fragmentos anterior e posterior foram clonados ao lado um do outro, conforme apresentado na Figura 6. O fragmento anterior contendo a região codificante completa da gD foi somente separado por uma pequena parte do sítio de clonagem múltipla do pCR Blunt (aproximadamente 30 nucleotídeos entre o sítio blunt e o sítio NotI) do fragmento posterior que cobre o gene parcial US1.67 e parte da região repetida terminal. A parte curta deste sítio de clonagem múltipla do pCR-Blunt continha um sítio único para EcoRV que permitiu a inserção do cassete de expressão da proteína G do vírus de raiva de morcego, conforme apresentado na Figura 8.

Clonagem do gene G de raiva de morcego no vetor de expressão pVR1012

Até o presente momento, dois tipos de vacinas anti-rábicas são utilizadas para proteger bovinos contra raiva: a vacina viva atenuada Evelyn-Rokitnicki-Abelseth = ERA (ERAvac) e a vacina inativada contendo a amostra PV com adjuvante PV=Pasteur Vírus, (IPV vac). Ambas as vacinas são baseadas na raiva “clássica” ou “raiva de cães”. Se somente anticorpos forem detectados, a vacina PV induz altos títulos de anticorpos em terneiros após o reforço vacinal, o que não ocorre com a vacina ERA. Entretanto, após o uso de tanto a ERA viva modificada como a vacina inativada PV os níveis de anticorpos detectáveis declinam rapidamente [Oliveira et al. (2000). *Immune response in cattle vaccinated against rabies*. Mem Inst. Oswaldo Cruz 95:83-88]. Embora tenha sido demonstrado que tais vacinas induzem anticorpos em gado, a eficácia de tais vacinas é, para dizer o mínimo, questionável, considerando que o valor da resposta de anticorpos para estimar a eficácia destas vacinas é duvidosa, já que os parâmetros da resposta imune celular que se correlacionam com a proteção contra o desafio não são avaliados [Zanetti et al. (1998) *Failure of protection induced by a Brazilian vaccine against Brazilian wild rabies viruses*. Arch. Virol. 143:1745-1756].

Um gene útil para inserir em um vetor vacinal mutante como fornecido pela invenção é pelo menos a parte imunogênica da proteína G do vírus rábico. É claro que é melhor incorporar toda a proteína G no mutante, como aqui descrito, entretanto, restringindo ela a somente uma parte imunogênica é factível, desde que a parte resultante tenha a imunogenicidade desejável, o que pode ser testado através de testes de imunoprecipitação ou experimentos de proteção. A glicoproteína G é

uma proteína transmembrana do tipo 1 localizada no envelope viral e está relacionada ao reconhecimento de receptores celulares e fusão de membranas e é necessária para o transporte axonal [Eteessami et al. (2000) *Spread and pathogenic characteristics of a G- deficient rabies vírus recombinant: an in vitro and in vivo study*. J Gen Virol. 81:2147-2153]. As regiões codificantes da proteína G do vírus rábico contém aproximadamente 557 aminoácidos, começando com um peptídeo sinal de 20-24 aminoácidos seguido de um ectodomínio de 450 aminoácidos, uma região transmembrana com 20 aminoácidos e um endodomínio com 50 aminoácidos. A região entre os resíduos 189-214 forma o provável domínio de ligação para o receptor de acetil colina nicotínico, o qual foi identificado como um receptor RV [Hanham et al. (1993) *Evidence from the anti idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies vírus receptor*. J Virol. 67:530-542]. A proteína G do vírus rábico está associada com a virulência e especialmente um resíduo de arginina ou lisina da posição 333 da proteína G é importante para a função de virulência viral [Tuffereau et al. (1989) *Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice*. Virology 172:206-212]. As proteínas G dos vírus rábicos são também o principal antígeno protetor [Foley et al. (2000) *A recombinant rabies vírus expressing vesicular stomatitis vírus glycoprotein fails to protect against rabies vírus infection*. Proc Natl Acad Sci USA. 97:14680-14685]. Proteínas G induzem anticorpos vírus-neutralizantes [Wiktor et al. (1973) *Antigenic properties of rabies vírus components*. J Immunol. 110:269-276], linfócitos T citotóxicos [Macfarlan et al. (1986) *Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies vírus glycoprotein and identification of the immunodominant domain*. Mol Immunol. 23:733-741] e linfócitos T auxiliares [Celis et al. (1988) *Recognition of rabies and*

rabies related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. J Virol. 62:3128-3134].

Quando as 55 presentemente conhecidas seqüências de proteínas G do Lyssavirus são comparadas, pode ser observado que somente 5 54% dos aminoácidos são conservados. As proteínas G são, desta forma, os determinantes primários de diversidade de grupo ([Badrane & Tordo (2001), conforme Figura 10. A troca de hospedeiro no histórico dos lyssavírus da ordem Chiroptera para a ordem Carnívora. J Virol. 75:8096-8104]. Entretanto, dentro de cada grupo o grau de conservação 10 de aminoácidos das proteínas G é alto. Por exemplo, dentro do grupo de vírus rábicos de morcegos pertencentes ao grupo Lyssavirus de Quirópteros do genótipo 1, o grau de conservação aminoácidos da proteína G é superior a 95 % [Compare por exemplo a seqüência da proteína G dos vírus de morcegos, do isolado ARG1-BT (número de 15 acesso AF325493), do isolado BRA2-BV (acesso número AF325491), MEX2-BT (acesso número AF325492) e GUY1-BV (acesso número AF325490)]. Favoretto et al. (2002, Rev. Inst Méd Trop S Paulo 44:91-95) observaram que em 100 % dos 34 casos estudados de raiva em bovinos do Brasil, os isolados de raiva pertenciam à variante antigênica 20 número três. Esta é a variante que é encontrada no morcego hematófago *Desmodus rotundus* e pertence ao grupo de lyssavírus dos quirópteros, genótipo 1. Uma vacina para proteger bovinos contra raiva deve então preferencialmente ser direcionada contra o grupo de lyssavírus de quirópteros do genótipo 1, dos quais a seqüência protótipo 25 é dada na Figura 1. Entretanto, em outras áreas, onde outros vírus rábicos circulam, outra seqüência de aminoácidos da proteína G pode ser selecionada. Como na seqüência de ácidos nucléicos da proteína G selecionada, é preferível que ela seja relativamente livre de sinais de

processamento U2. Além disto, a invenção fornece um mutante em que o polipeptídeo é codificado por um ácido nucléico que essencialmente não contém sinais de processamento do tipo U2, tal gene, aqui também chamado de gene sintético por causa disto, embora codificando um polipeptídeotipo selvagem ou praticamente tipo selvagem, o gene que

5 codifica o dito peptídeo não contém estrutura que essencialmente são encontradas na proteína tipo selvagem.

Para a expressão da proteína G do vírus da raiva de morcego como codificada pela seqüência de nucleotídeos apresentada na Figura 1, o

10 fragmento Stul de 1590 pares de bases obtido do plasmídeo pBC-RGRESM como mostrado na Figura 2, foi clonado dentro do sítio de EcoRV do vetor de expressão pVR1012 na mesma orientação das seqüências cis-regulatórias presente no vetor de expressão eucariótico. Na construção resultante, chamada pVR1012-RGRESM, a região

15 codificante da proteína G do vírus rábico está localizada atrás do promotor do citomegalovírus humano imediatamente cedo 1 (promotor hCMVie1) e a sua região 5' não traduzida (5'UT), e acima da seqüência terminadora do hormônio de crescimento bovino (BT), conforme apresentado na Figura 7. O promotor hCMVie1 é conhecido por ser ativo

20 em vários tipos de células eucarióticas e também no background de uma infecção por alfa herpesvírus. A região 5'UT contém um intron flanqueado por sinais de processamento canônicos doadores e receptores do tipo U2, estimulando a exportação de RNAm do núcleo e possivelmente competindo por eventos de processamento indesejáveis

25 na região codificante do proteína G do vírus da raiva de morcego. A seqüência BT auxilia a evitar que o pré-RNAm transcrito do cassete de expressão se tornará muito longo e conterá um sinal para processamento em um sítio de poliadenilação perto do do final da

região codificante. Ambos os eventos regulatórios melhoram a estabilidade do RNAm e levam a uma expressão mais alta da proteína codificada.

5 **Clonagem do cassete de expressão de raiva de morcego no plasmídeo de recombinação/deleção do BHV-5 pAC226**

Para permitir a recombinação do cassete de expressão da proteína G do vírus da raiva de morcego no genoma da amostra EVI88 de BHV-5 no sítio dos genes gI, gE e US9, o cassete de expressão da proteína G da raiva de morcego foi clonado no plasmídeo de deleção/recombinação
10 pAC226, entre os fragmentos anterior e posterior da deleção. Para isto, o cassete de expressão da proteína G do vírus da raiva de morcego foi liberado do clone pAC226-VR1012-RGRESM usando as enzimas de restrição MscI and Acc65I. O fragmento resultante de 3,6 kb MscI-Acc65I foi feito blunt e clonado dentro do sítio EcoRV localizado entre os
15 fragmentos anterior e posterior no pAC226. O cassete de expressão da proteína G da raiva de morcego foi clonado na mesma orientação do gene gD anterior e o gI, gE e US9 que foram substituídos, conforme Figura 8 em anexo.

20 **Construção e isolamento do mutante deletado BHV-5 gI/gE/US9 expressando a região codificante da proteína G de raiva de morcego chamado BHV-5-hCMV-RGRESM-ACF7**

Conforme descrito na Figura 9, a construção do recombinante BHV-5/G de raiva de morcego que expressa a proteína G da raiva de morcego, cuja seqüência de aminoácidos é apresentada na Figura 1, foi
25 feita conforme segue.

Primeiro o plasmídeo linearizado pAC226-VR1012-RGRESM, como mostrado na Figura 8, foi co-transfectado junto com DNA genômico purificado da amostra EVI88 de BHV-5 em células de traquéia de

embrião bovino (EBTr) usando o método de transfecção mediada por fosfato de cálcio descrita por Graham & van der Eb (1973, a new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52:456-467) e quarenta e oito horas após a co-transfecção as

5 células foram congeladas e descongeladas para liberar possíveis vírus recombinantes. Para isolar tais vírus recombinantes, os fragmentos celulares foram peletados e o sobrenadante foi utilizado para infectar novas monocamadas celulares de EBTr em microplacas de 96 orifícios e para identificar orifícios positivos para a raiva de morcego usando um

10 procedimento de imunquímica com soro anti-proteína G de raiva de morcego. O vírus no sobrenadante de orifícios positivos para o soro anti-proteína G de raiva de morcegos foi diluído para infectar células bovinas em outra microplaca de 96 orifícios contendo monocamadas de EBTr. Vírus de poços contendo placas isoladas positivas para a proteína G do

15 vírus da raiva de morcego foram purificadas três vezes para obter um recombinante BHV5/G de raiva de morcego. Um dos recombinantes obtido desta forma foi chamado BHV-5-hCMV-RGRESM ACF7. Este vírus é um mutante com uma tripla deleção com respeito aos genes que codificam as glicoproteínas gI e gE e a proteína US9, carregando o

20 cassete de expressão hCMV que contém um gene sintético que codifica a proteína G do vírus de raiva de morcego no sítio da deleção tripla, conforme Figura 9.

Isolamento de um mutante natural gI/gE/US9, gE/US9 ou US9 de BHV-5

25 Para isolar um vírus deletado naturalmente nos genes que codificam a gI/gE/US9, o protocolo descrito a seguir foi realizado. O protocolo é baseado na observação de que estes vírus deletados são preferencialmente liberados mais cedo durante a replicação de uma

célula infectada do que um vírus selvagem. Se necessário, inicialmente um período de tempo pode ser determinado no qual o vírus mutante gl/gE/US9 negativo é secretado melhor de células Ebtr do que a amostra parental EVI88 ou outra amostra de BHV-5. Entretanto isto não é necessário, é suficiente coletar o vírus durante um período claramente restrito no qual esta secreção preferencial ocorra. Para melhor acomodar isto, o tempo de infecção é preferencialmente limitado. Assim, células Ebtr ou outra célula suscetível é infectada com uma amostra selvagem de BHV-5 (por exemplo EVI88) a uma M.O.I. de 10 e uma hora após a infecção as células infectadas são tratadas com citrato de sódio, pH 3, para inativar vírus extracelulares. No tempo ótimo após a infecção, o que dependendo das condições do cultivo celular fica entre 9 a 10 horas após a infecção, o meio dos cultivos celulares é coletado e usado para infectar outra monocamada de células suscetíveis. Isto é feito para expandir a população viral que está favorecida para deleções espontâneas dos genes gl/gE/US9 de BHV-5. Esta população viral é usada para uma nova etapa de enriquecimento. Otimamente, um total de 5 a 8 ciclos de enriquecimento são feitos e do último, 400-600 placas virais são obtidas e isoladas e testadas para a expressão da gl utilizando-se um soro anti gl para identificar vírus gl negativos. Os vírus gl negativos identificados são a seguir testados para a expressão da gE com um soro anti gE e para a US9, com um soro anti-US9. Os vírus resultantes que são gl/gE/US9 negativos são purificados três vezes e o tamanho da deleção é analisado com enzimas de restrição. Um protocolo similar é aplicado para isolar vírus gE/US9 negativos ou US9 negativos de BHV-5.

Tem sido demonstrado que a mutação somente de um gene relacionado à neurovirulência não resulta em tal redução suficiente para

que o vírus possa ser utilizado como vacina viva atenuada; pelo menos dois genes relacionados a neurovirulência deve ser funcionalmente deletado. É preferível que pelo menos dois genes sejam selecionados do grupo de genes identificáveis como gene da glicoproteína I (gI), gene da glicoproteína E (gE), gene da glicoproteína C (gC) e gene da US9. Melhor que Preferencialmente os genes dois genes sejam selecionados do grupo de genes identificáveis como gene da glicoproteína I (gI), gene da glicoproteína E (gE) e gene da US9. Uma vantagem adicional de deletar dois genes é que pelo menos um dos dois terá chance de ser usado como um marcador genético, dentro do contexto de vacinação contra BHV-5 é preferível dizer que a função de marcador genético é realizada pelo gene da glicoproteína E (gE), o qual então deve ser deletado de tal forma que nenhum fragmento antigênico permaneça. Tal mutante deletado pode ser obtido através da técnica de enriquecimento de mutantes naturais gI ou gE negativos, pela infecção de cultivos celulares com uma amostra parental de BHV-5, como descrito abaixo.

Investigação da patogenicidade da amostra BHV-5 gI/gE/US9- e verificação se a deleção dos genes que codificam as glicoproteínas I (gI), E (gE) e a proteína US9 são suficientes para a atenuação da neurovirulência viral

Foram feitos testes com dois grupos de coelhos de quatro a seis semanas de idade, inoculados com 10^8 doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares ($DICC_{50}$) do vírus deletado (grupo A, 23 coelhos) e da amostra EVI88 de BHV-5 (grupo B, 23 coelhos). Um terceiro grupo de coelhos (grupo C, 14 animais) foi mantido como controle e foi inoculado com meio de cultivo de células estéril. O vírus mutante induziu sinais clínicos leves em comparação com o vírus selvagem. Os sinais clínicos foram observados entre os dias 6 e 14 dias pós inoculação. Os sinais

observados foram pirexia, apatia, tosse, espirros, convulsões, tremores musculares, coma e morte. Nos animais do grupo A, 17 % dos coelhos infectados com o vírus mutante apresentaram sinais clínicos de encefalite e morreram. Nos animais do grupo B, 74 % apresentaram
5 sinais clínicos de encefalite e morreram. Nenhum animal do grupo controle apresentou sinais clínicos da infecção ou morte.

Com o objetivo de analisar a patogenicidade do vírus BHV-5 gl/gE/US9- no seu hospedeiro natural, foi ainda realizado um experimento de inoculação deste vírus e do vírus EVI88 em terneiros e
10 os resultados foram comparados. Seis terneiros com quatro meses de idade foram inoculados por via intranasal com o vírus BHV-5 gl/g/EUS9- e outros seis animais da mesma idade foram inoculados com a mesma quantidade de vírus, 10^8 DICC₅₀. Todos os animais eram livres de anticorpos neutralizantes antes do início do experimento. Os animais
15 foram observados diariamente após a inoculação para avaliar a presença de sinais clínicos, elevação de temperatura e ainda suabes nasais foram coletados. No dia 14 após a inoculação, os animais foram sacrificados e amostras de tecidos foram coletadas para análise histopatológica e para avaliação da presença de vírus. Os resultados
20 mostraram que nenhum dos terneiros inoculados com o vírus BHV-5 gl/gE/US9- apresentou febre ou outro sinal clínico da infecção pelo BHV-5. Também não foi encontrado vírus no sistema nervoso dos animais, pelo uso da técnica de imunohistoquímica. Além disto, não foram observadas alterações histopatológicas nos tecidos nervosos destes
25 animais. O vírus BHV-5 gl/gE/US9- foi isolado de suabes nasais coletados nos dias 1, 2, 3 e 4 pós inoculação em títulos baixos, conforme apresentado na Figura 11. Anticorpos neutralizantes foram observados nestes animais, conforme Figura 12 anexa. Entre os

terneiros inoculados com a amostra EVI88 de BHV-5, foi observada uma leve pirexia (1 °C) nos dias 3 e 4 pós inoculação e uma descarga nasal serosa a mucopurulenta a partir do dia 4 pós inoculação até o final do experimento. Foi observada anorexia a partir do dia 10 pós inoculação em diante. Os sinais neurológicos observados foram hipersalivação, tremores musculares, ataxia e episódios semelhantes a convulsões. Picos de excreção viral a partir dos suabes nasais foram observados entre os dias 1 e 5 pós inoculação, conforme Figura 11. Vírus infeccioso e alterações histopatológicas foram detectadas disseminadas pelo sistema nervoso central. Estes resultados mostram que o vírus BHV-5 gl/gE/US9- foi avirulento para terneiros sob condições experimentais. Além disto, o vírus BHV-5 gl/gE/US9- replicou e disseminou de forma ineficiente no sistema nervoso central de terneiros quando comparados com o vírus selvagem BHV-5 EVI88.

REIVINDICAÇÕES:

1. Um mutante de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) que contenha uma deleção funcional em cada um dos genes relacionados a manifestações clínicas de neurovirulência após uma infecção de um hospedeiro pelo BHV-5.
2. Um mutante, de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos dois genes sejam selecionados do grupo de genes identificados como o gene da glicoproteína I (gI), o gene da glicoproteína E (gE), o gene da glicoproteína C (gC) e o gene da proteína US9.
3. Um mutante, de acordo com a reivindicação 2, em que pelo menos dois genes sejam selecionados do grupo de genes identificados como o gene da glicoproteína I (gI), o gene da glicoproteína E (gE), e o gene da proteína US9.
4. Um mutante, de acordo com as reivindicações 2 ou 3, que contenha uma deleção em cada dos pelo menos três genes relacionados a manifestações clínicas de neurovirulência após uma infecção de um hospedeiro pelo BHV-5.
5. Um mutante, de acordo com a reivindicação 4, que contenha uma deleção funcional em cada um dos gene da glicoproteína I (gI), o gene da glicoproteína E (gE), e o gene da proteína US9.
6. Um mutante, de acordo com as reivindicações 1 a 5, em que a dita deleção funcional leva à total falta de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, nos quais a dita deleção funcional fornece a completa falta de expressão de um polipeptídeo codificado por pelo menos um dos genes relacionados a manifestações clínicas de neurovirulência após uma infecção de um hospedeiro com o BHV-5 durante a replicação do dito mutante no hospedeiro.

7. Um mutante de acordo com a reivindicação 6, em que pelo menos um gene contém o gene da glicoproteína I (gI), o gene da glicoproteína E (gE) e gene da US9.
8. Um mutante de acordo com a reivindicação 6, em que a completa
5 falta de expressão do dito polipeptídeo durante a replicação do dito mutante em um hospedeiro permita o teste do dito hospedeiro e a determinação se o dito hospedeiro foi infectado com um segundo BHV-5 capaz de expressar o dito polipeptídeo.
9. Um mutante de acordo com a reivindicação 8, em que o dito
10 segundo BHV-5 seja um vírus selvagem.
10. Um mutante de acordo com as reivindicações 8 ou 9, em que o dito teste é capaz de determinar a presença ou ausência de anticorpos específicos dirigidos contra o dito polipeptídeo no dito hospedeiro.
11. Um mutante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
15 10, adicionalmente provido com um ácido nucléico que codifica um (poli) peptídeo imunogênico derivado de um patógeno outro que não o BHV-5.
12. Um mutante, de acordo com a reivindicação 11, em que o dito patógeno é um vírus.
- 20 13. Um mutante, de acordo com a reivindicação 12, em que o vírus é um vírus rábico.
14. Um mutante, de acordo com a reivindicação 13, em que o dito (poli) peptídeo contém uma parte da proteína G do vírus rábico.
15. Um mutante, de acordo com a reivindicação 14, em que a dita
25 proteína G é derivada de um vírus de raiva de morcego.
16. Um mutante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, em que o dito (poli) peptídeo é codificado por um ácido nucléico que essencialmente não contenha seqüências de sinais de

processamento do tipo U2 preditos.

- 5
- 17.** Um método para preparar uma vacina dirigida contra encefalite viral bovina em ruminantes contendo uma composição de um mutante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, e um diluente ou carreador adequado.
- 10
- 18.** Um método para o preparo de uma vacina com duplo propósito dirigida contra encefalite viral em ruminantes e dirigida contra uma doença causada por outro patógeno contendo uma composição de um mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16 e um diluente ou carreador adequado.
- 19.** Um método, de acordo com a reivindicação 18, em que o outro patógeno é o vírus rábico.
- 20.** Um método, de acordo com as reivindicações 17 a 19, em que a dita vacina é uma vacina viva modificada.
- 15
- 21.** Uma vacina compreendendo um mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações entre 1 e 16.
- 22.** Um método para distinguir um ruminante infectado com uma amostra selvagem de BHV-5 ou vacinado contra BHV-5 em uma população de ruminantes vacinados com uma vacina de acordo com a reivindicação 21 compreendendo o teste de um ruminante para a presença ou ausência de um anticorpo dirigido contra a glicoproteína I (gI), a glicoproteína E (gE) ou ambas.
- 20
- 23.** Um kit de teste fornecido com meios para realizar um método de acordo com a reivindicação 22.

RESUMO**MUTANTE DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5, VACINA DIRIGIDA
CONTRA A ENCEFALITE VIRAL BOVINA (BHV-5) E O VÍRUS
RÁBICO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA VACINA**

5 É descrito um mutante de herpesvírus bovino tipo 5, uma vacina
dirigida contra a encefalite viral bovina (bhv-5) e o vírus rábico e um
método de preparação da dita vacina, sendo que o mutante de
herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) contém uma deleção funcional em
cada um de pelo menos dois genes relacionados a manifestações
10 clínicas de neurovirulência após a infecção de um hospedeiro com BHV-
5. Além disto, a invenção fornece uma vacina que compreende tal
mutante. A invenção ainda fornece um método para distinguir um
ruminante infectado com uma amostra selvagem de BHV-5 ou vacinado
contra BHV-5 em uma população de ruminantes vacinados com uma
15 vacina de acordo com a invenção compreendendo o teste de um
ruminante para a presença ou ausência de anticorpos dirigidos contra a
glicoproteína I (gI), a glicoproteína E (gE) ou ambas.

FIGURA 1

 * TRADUÇÃO DE UMA SEQUENCIA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS *

Feito sobre a sequencia de DNA RGRESM.
 O número total de bases é: 1598.
 Análise feita sobre a sequência completa.
 Feito sobre fase(s)2(absoluta).
 Usando o código genético Universal.

```

-----
          10          20          30          40          50          60
          |           |           |           |           |           |
AAGGCCTGCCGCCCACCATGATCCTTCAAGCCCTTCTCTTTGTCCCTTTCCTGATCTCTTC

  StuI   Kozak  METIleLeuGlnAlaLeuLeuPheValPropheLeuIleSerSer

          70          80          90          100          110          120
          |           |           |           |           |           |
CCTCTGCCTCGGGAAATTCCCCATCTACACAATACCCGACAAACTCGGCCCTTGGAGCCC

  LeuCysLeuGlyLysPheProIleTyrThrIleProAspLysLeuGlyProTrpSerPro

          130          140          150          160          170          180
          |           |           |           |           |           |
CATCGATATACATCACCTCTCCTGCCCAAATAATTTGGTCGTCGAAGACGAAGGATGCAC

  IleAspIleHisHisLeuSerCysProAsnAsnLeuValValGluAspGluGlyCysThr

          190          200          210          220          230          240
          |           |           |           |           |           |
CAGTCTATCTGGATTCTCTTACATGGAACATAAAGTCGGATACATCTCTGCCATAAAAGT

  SerLeuSerGlyPheSerTyrMETGluLeuLysValGlyTyrIleSerAlaIleLysVal

          250          260          270          280          290          300
          |           |           |           |           |           |
CAACGGCTTCACTTGTACCGGCGTCGTCACAGAAGCTGAAACCTATACCAACTTTGTCCGG

  AsnGlyPheThrCysThrGlyValValThrGluAlaGluThrTyrThrAsnPheValGly

          310          320          330          340          350          360
          |           |           |           |           |           |
CTATGTCACACCCACATTCAAGCGCAAACATTTCCGCCCTATACCGGATGCATGCCGCGC

  TyrValThrProThrPheLysArgLysHisPheArgProIleProAspAlaCysArgAla

          370          380          390          400          410          420
          |           |           |           |           |           |
TGCATACAACCTGGAAAATGGCAGGCGATCCCCGATATGAAGAATCTCTCCAAAATCCTTA
  
```

AlaTyrAsnTrpLysMETAlaGlyAspProArgTyrGluGluSerLeuGlnAsnProTyr

430 440 450 460 470 480
| | | | | |
TCCTGATTACCACTGGCTACGGACCGTCAAAACCACTAAAGAATCTCTTATCATCATATC

ProAspTyrHisTrpLeuArgThrValLysThrThrLysGluSerLeuIleIleIleSer

490 500 510 520 530 540
| | | | | |
TCCGTCTGTGCTGATCTAGACCCATATGACAAATCCCTTCATTCTCGCGTCTTCCCTGG

ProSerValAlaAspLeuAspProTyrAspLysSerLeuHisSerArgValPheProGly

550 560 570 580 590 600
| | | | | |
CGGGAAATGCTTGGGAATAACAGTCTCCTCCACCTACTGCTCAACCAACCATGACTACAC

GlyLysCysLeuGlyIleThrValSerSerThrTyrCysSerThrAsnHisAspTyrThr

610 620 630 640 650 660
| | | | | |
CATCTGGATGCCCCGAAGAACCACGACTCGGGACATCTTGCACATTTTTTACCTCATCAA

IleTrpMETProGluGluProArgLeuGlyThrSerCysAspIlePheThrSerSerLys

670 680 690 700 710 720
| | | | | |
AGGGAAAAAAGCATCTAAAGGCGGCAAACTTGCAGATTCGTCGATGAACGCGGCCCTCTA

GlyLysLysAlaSerLysGlyGlyLysThrCysGlyPheValAspGluArgGlyLeuTyr

730 740 750 760 770 780
| | | | | |
CAAAAGTCTAAAAGGAGCATGCAAACCTCAAACCTCTGCGGAGTCCTCGGACTTAGACTTAT

LysSerLeuLysGlyAlaCysLysLeuLysLeuCysGlyValLeuGlyLeuArgLeuMET

790 800 810 820 830 840
| | | | | |
GGATGGAACCTGGGTCTCAATTCAAACATCCGACGATACCAAATGGTGCCTCCGGATCA

AspGlyThrTrpValSerIleGlnThrSerAspAspThrLysTrpCysProProAspGln

850 860 870 880 890 900
| | | | | |
ACTTGTC AATCTACATGACTTTCACCTCAGACGAAATCGAACATCTCGTCGTC AAAGAATT

LeuValAsnLeuHisAspPheHisSerAspGluIleGluHisLeuValValLysGluLeu

910 920 930 940 950 960

GGCGAAAAAACGCGAAGAATGCTTGGATGCATTGGAATCCATCATGACCACCAAATCCGT
 AlaLysLysArgGluGluCysLeuAspAlaLeuGluSerIleMETThrThrLysSerVal
 970 980 990 1000 1010 1020
 CTCTTTTCGACGACTCTCTATTTGCGAAAAGTAGTCCCGGATTTGGAAAAGCATAAC
 SerPheArgArgLeuSerTyrLeuArgLysLeuValProGlyPheGlyLysAlaTyrThr
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CATATTCAACAAAAGTTGATGGAGGCTGACGCCACTACAAATCCGTCGAAACTTGGAA

 *
 IlePheAsnLysThrLeuMETGluAlaAspAlaHisTyrLysSerVal**Glu**ThrTrpAsn
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CGAAATCATCCCTCAAAAGGATGCTTAAAAGTCCGCGAACGATGCCATCCTCCAGTCGA
 GluIleIleProSerLysGlyCysLeuLysValArgGluArgCysHisProProValAsp
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CGGCGTCTTCTCAACGGCATAATTCTCGGACCTGACGGGAATGTCCTGATACCAGAAAT
 GlyValPhePheAsnGlyIleIleLeuGlyProAspGlyAsnValLeuIleProGluMET
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCAATCCTCTACTTCAACAACATATGGAACCTTGGAAATCTTCTGTGATCCCCCTAAT
 GlnSerSerLeuLeuGlnGlnHisMETGluLeuLeuGluSerSerValIleProLeuMET
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GCATCCCTTGGCGGACCCGTCAACAGTCTTCAAAGAAGGGGATGAAGCGGAAGATTTTGT
 HisProLeuAlaAspProSerThrValPheLysGluGlyAspGluAlaGluAspPheVal
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CGAAGTTCACCTCCCGGATGTCCACAAACAAATCTCCGGCGTCGACCTTGGCTTCCCGTC
 GluValHisLeuProAspValHisLysGlnIleSerGlyValAspLeuGlyPheProSer
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TTGGGGGAAATATCTCCTGATGATTGCCGGCGGCTTGGCGACACTCGTTCTGATAATCTG

TrpGlyLysTyrLeuLeuMETIleAlaGlyGlyLeuAlaThrLeuValLeuIleIleCys
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 | | | | | |
 CTCGATGGCATGCTGCAGAAGAACCAAGCGAACAGAATCACGCCGGCGGGCTCTGGCGA
 SerMETAlaCysCysArgArgThrLysArgThrGluSerArgArgArgGlySerGlyGlu
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 | | | | | |
 ATCCGAAAAAAAAAGTCACGGCAACCCCCAAACTCGCAAAGTCGTATCTTCATGGGAATT
 SerGluLysLysValThrAlaThrProGlnThrArgLysValValSerSerTrpGluLeu
 1570 1580 1590
 | | |
 ATACAAATCAGAAGGCGATGCCCGCCTCTGAAGGCCTT
 TyrLysSerGluGlyAspAlaArgLeuSTOP-StuI

←-C

FIGURA 2

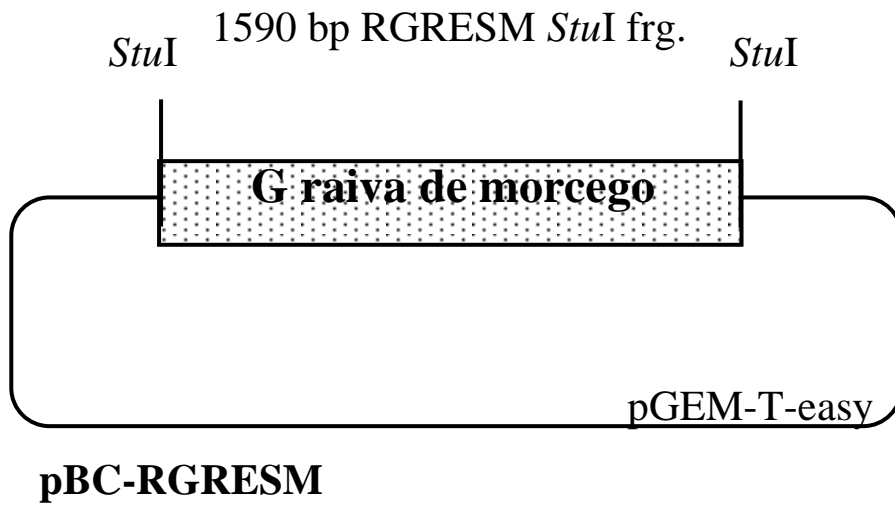


FIGURA 3

BHV5

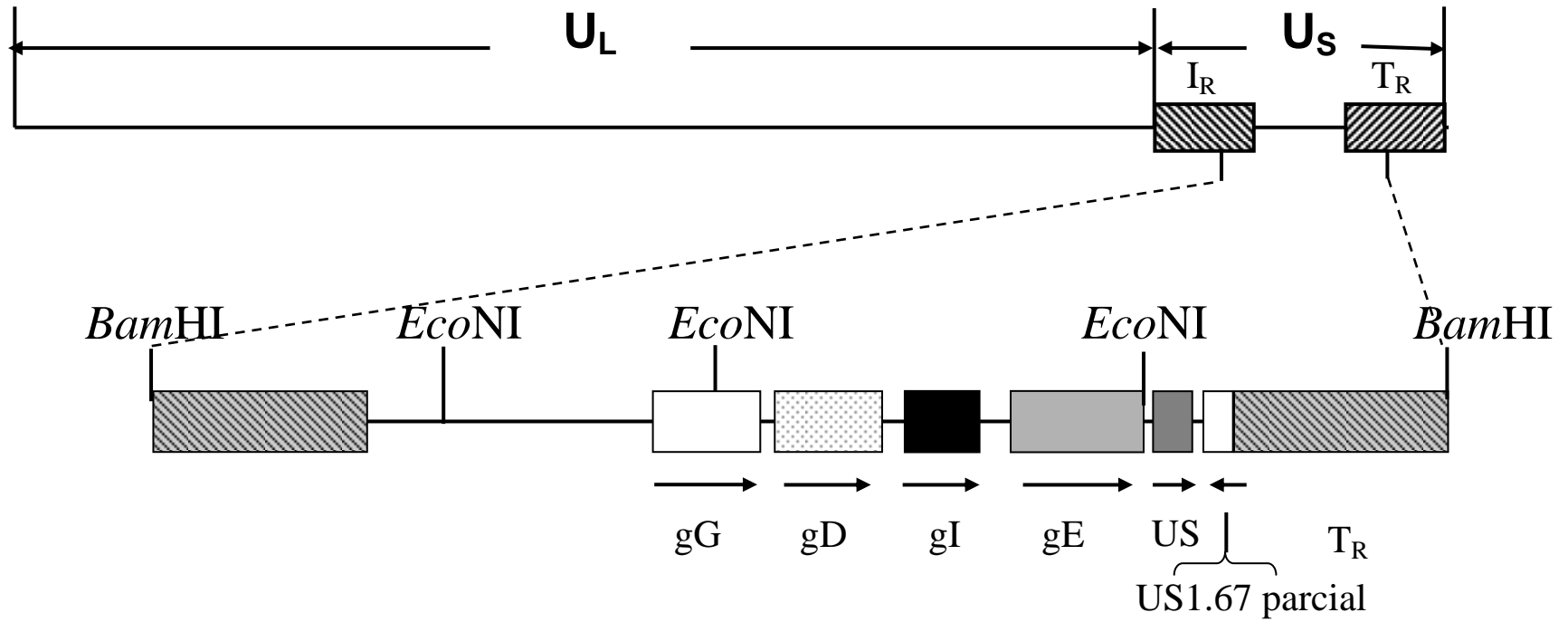


FIGURA 4

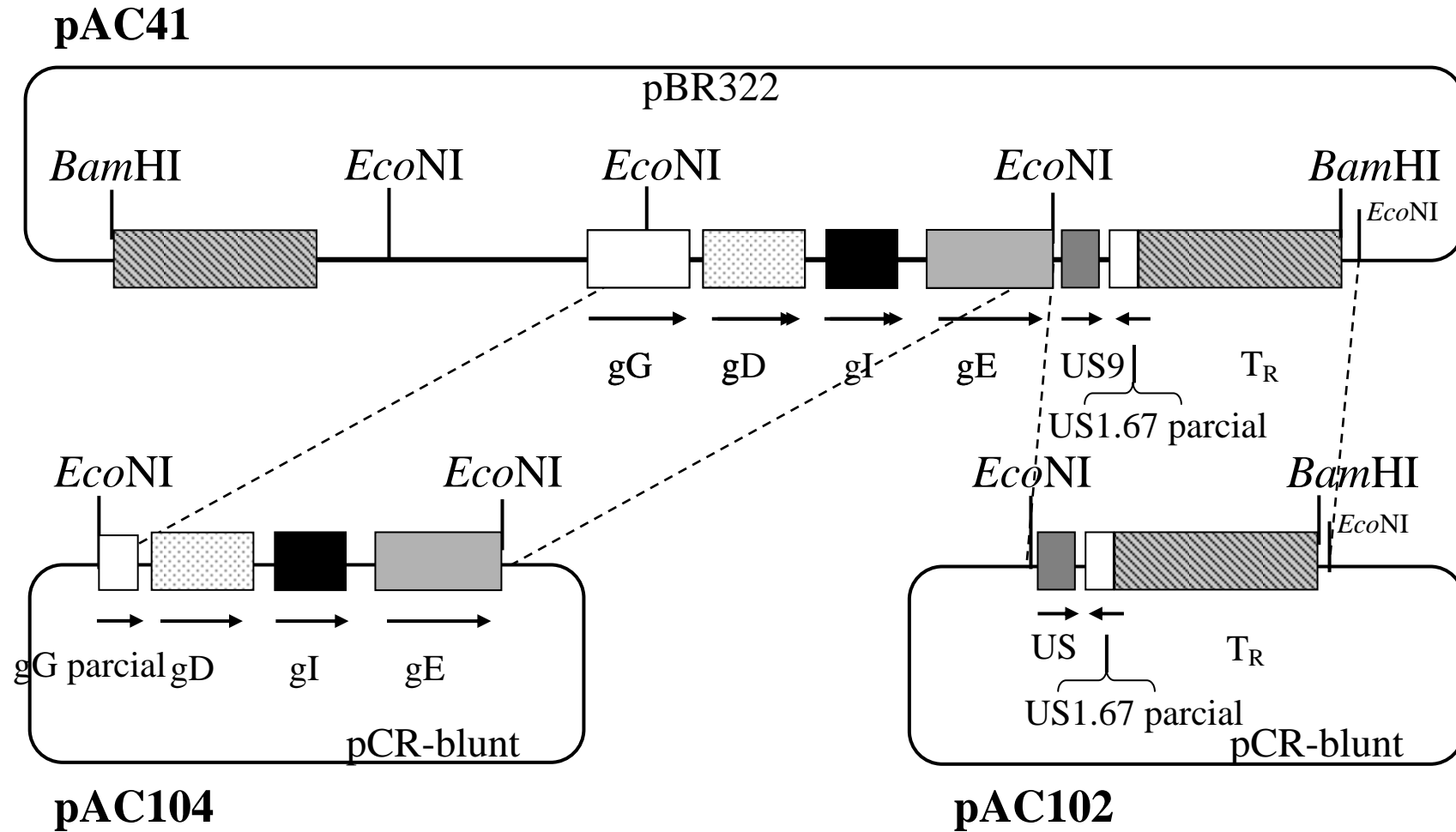


FIGURA 5

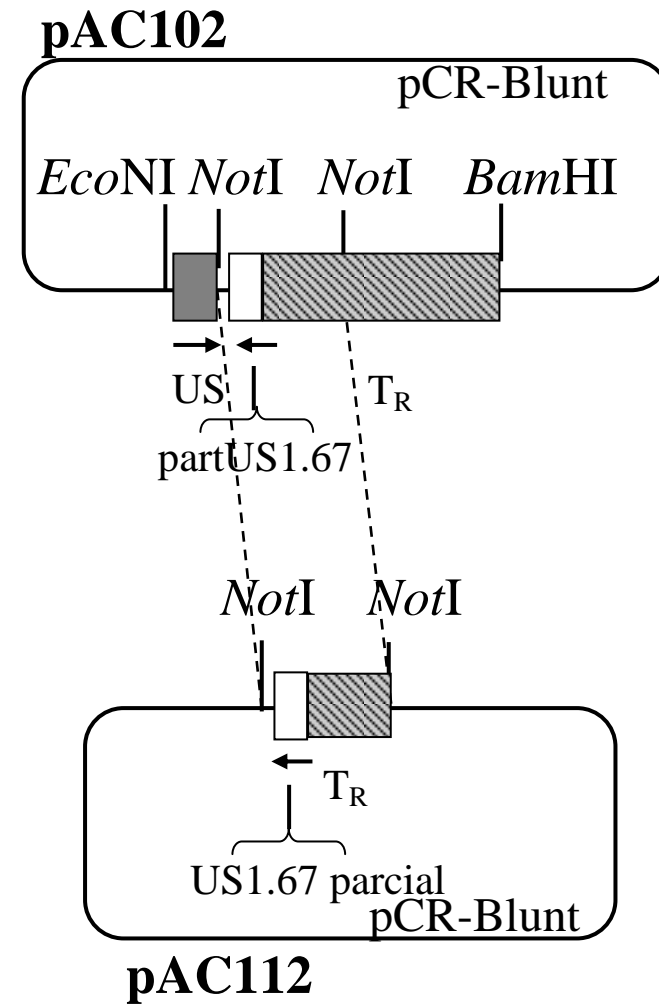
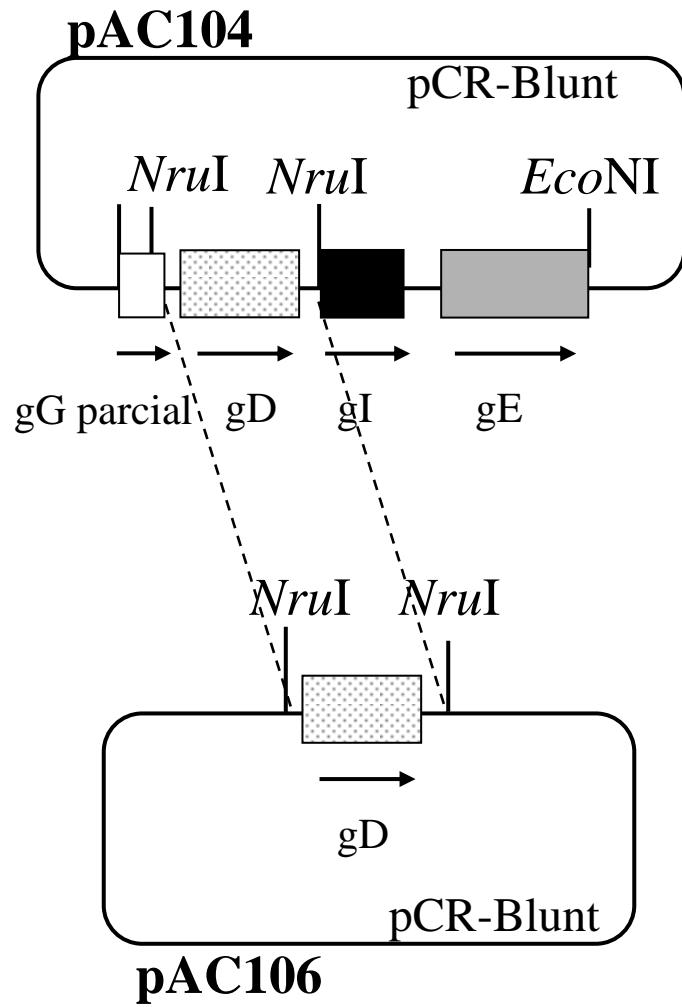


FIGURA 6

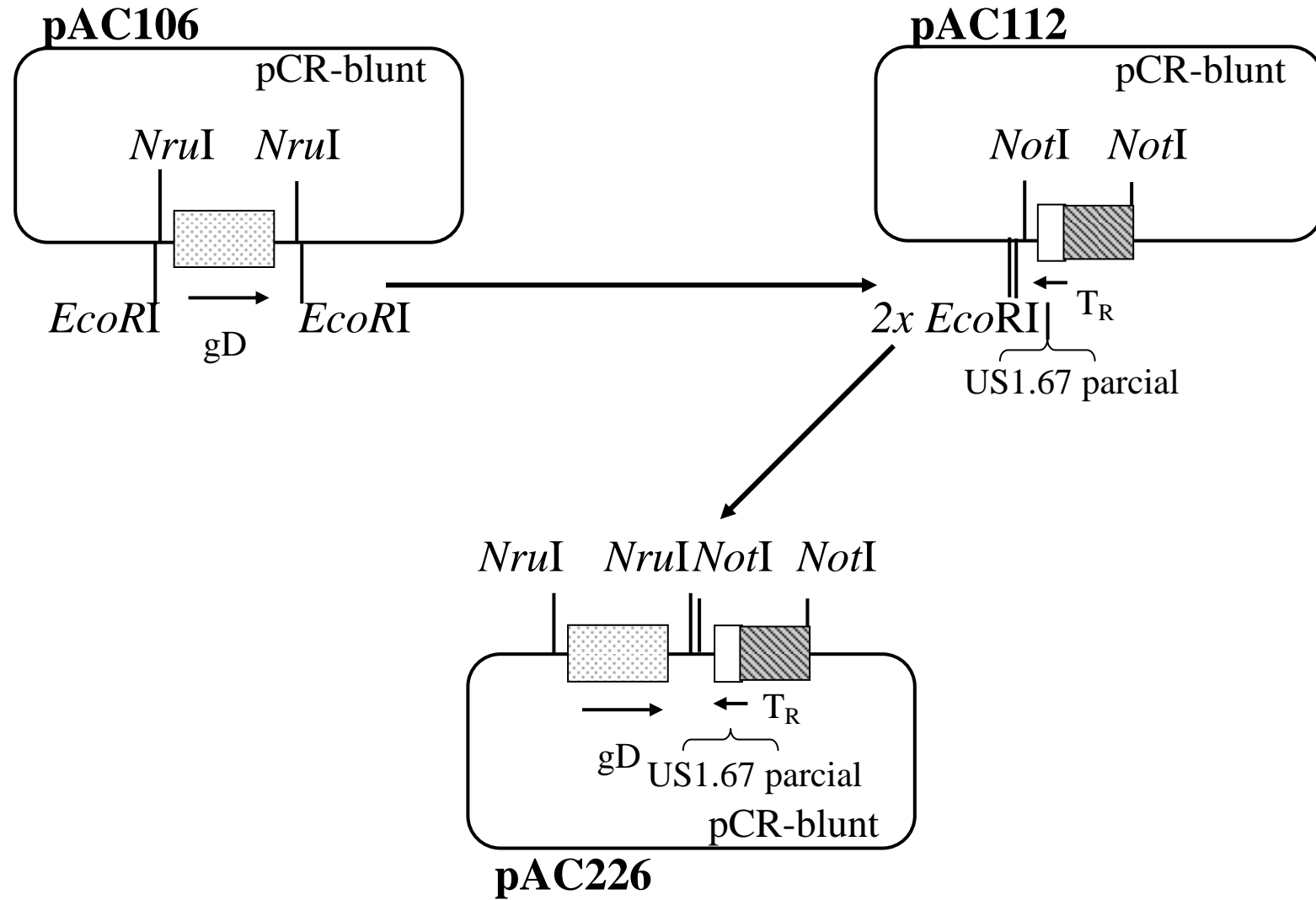


FIGURA 7

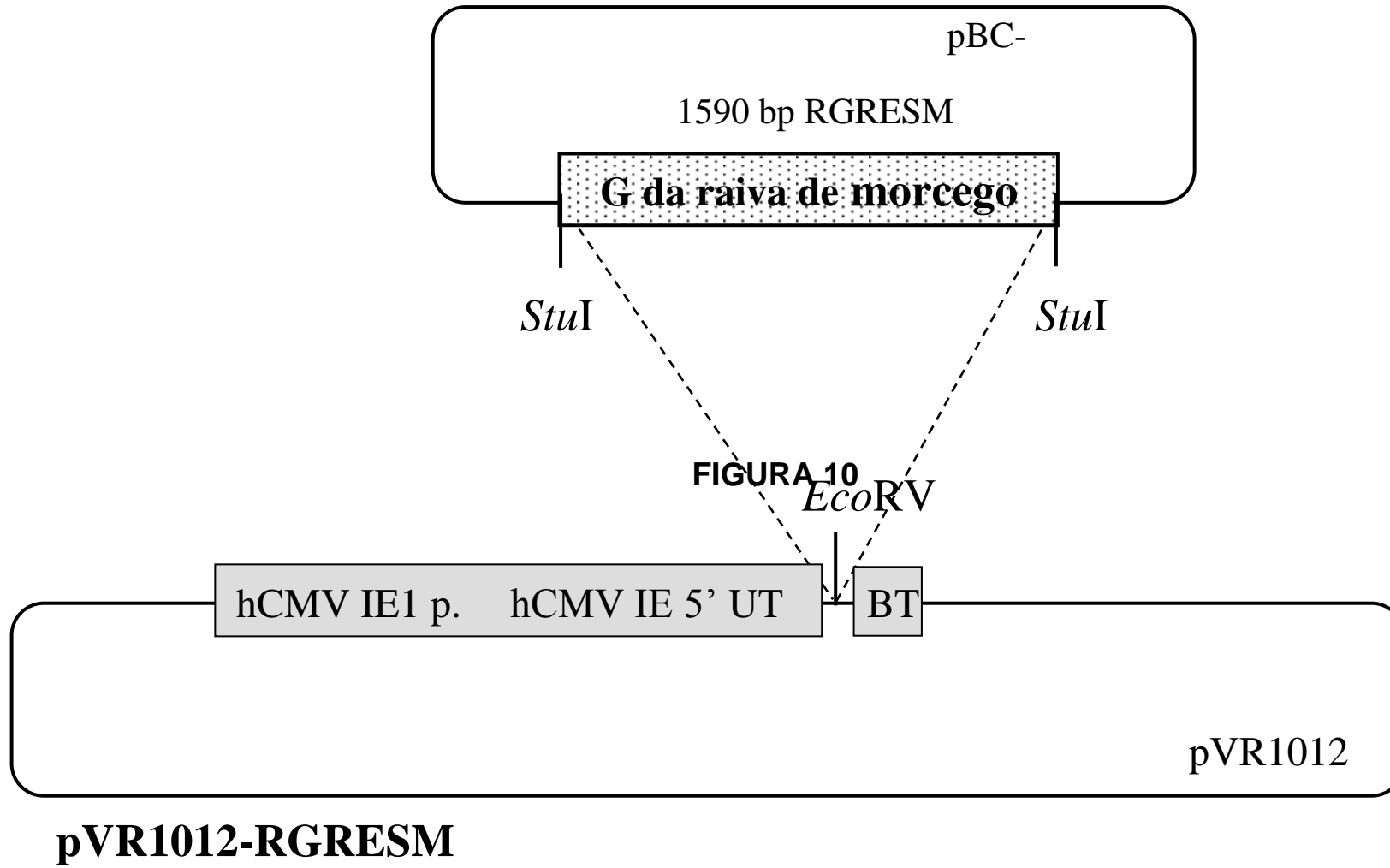


FIGURA 8

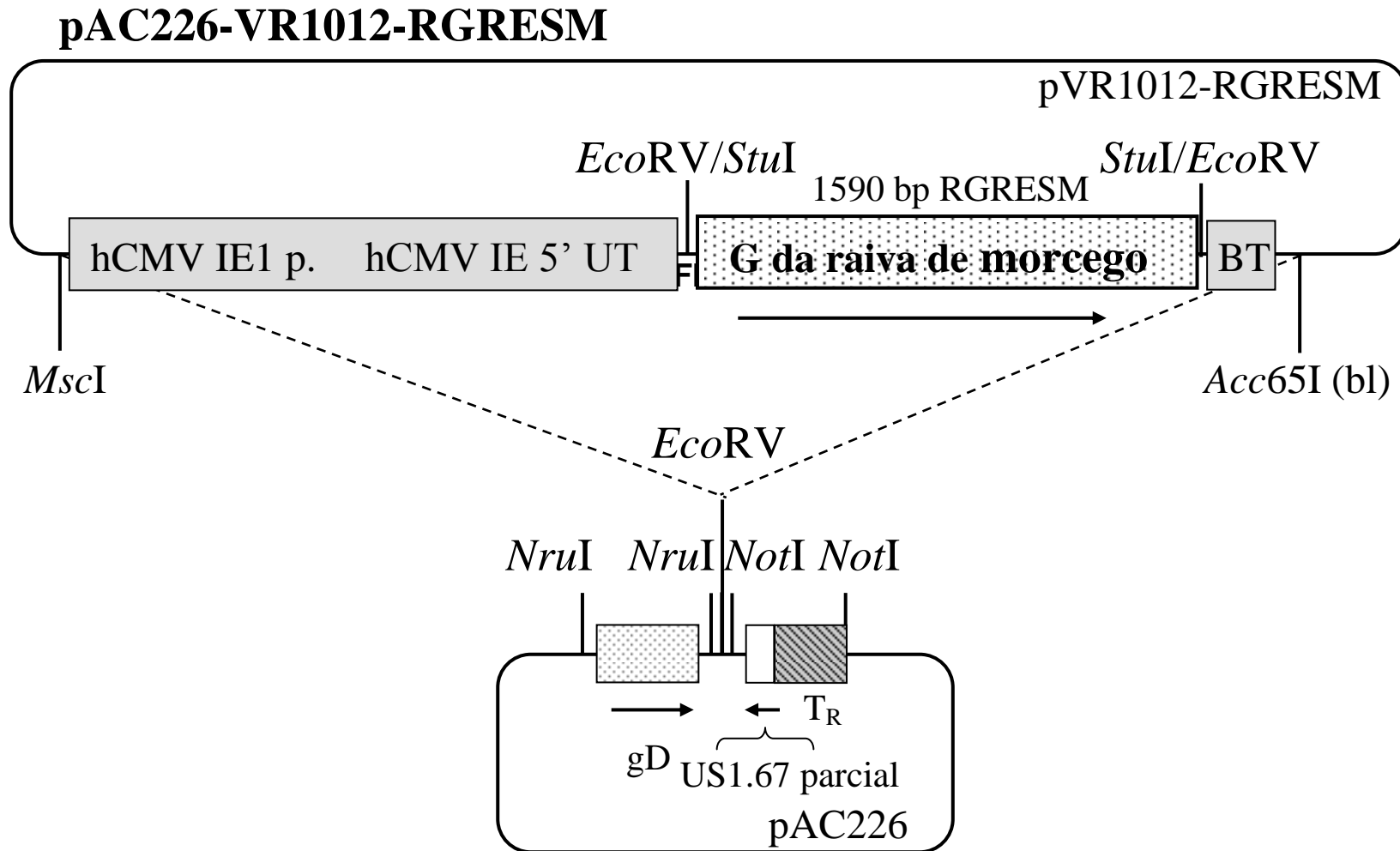


FIGURA 9

BHV5-hCMV-RGRESM-ACF7

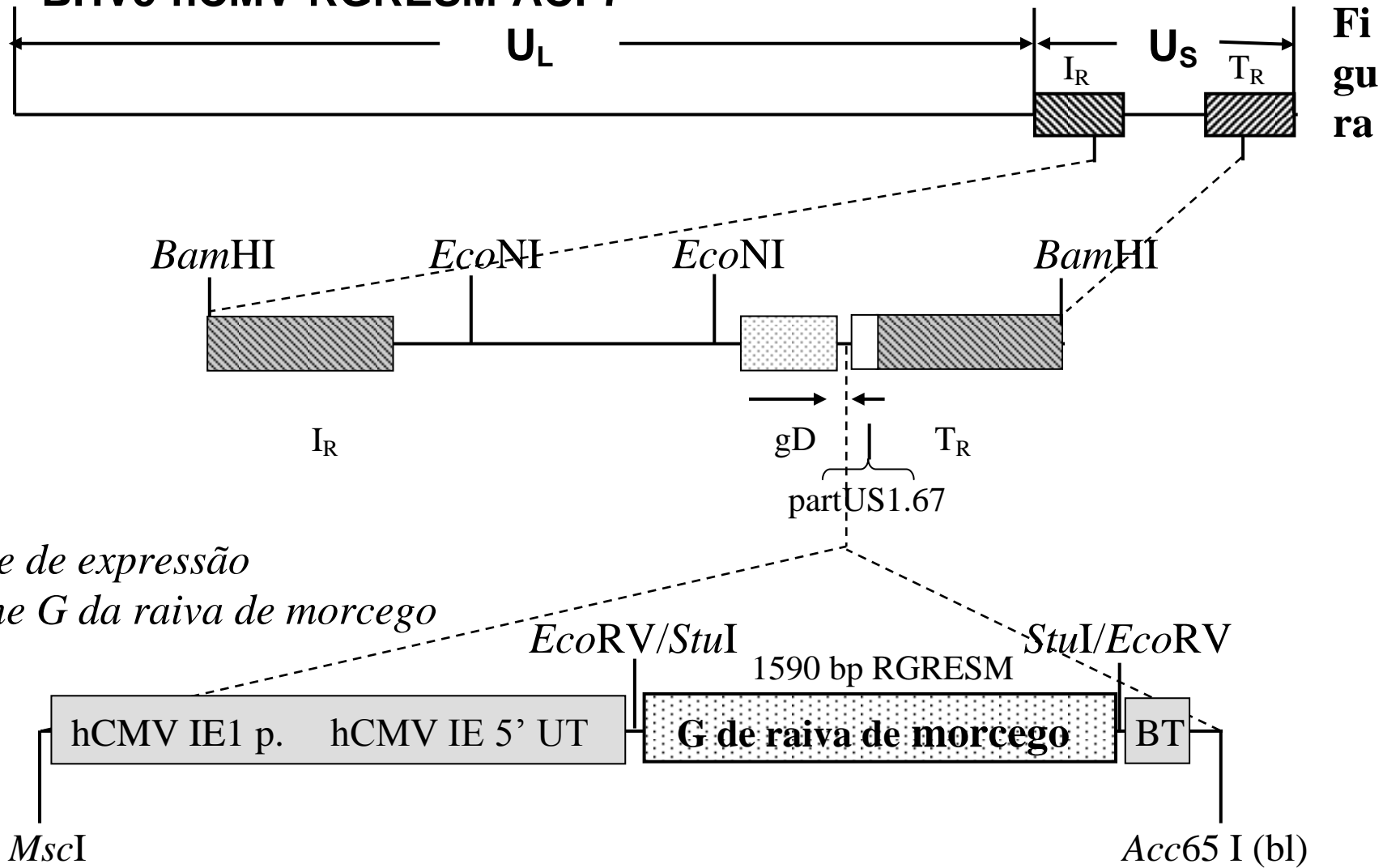


FIGURA 10

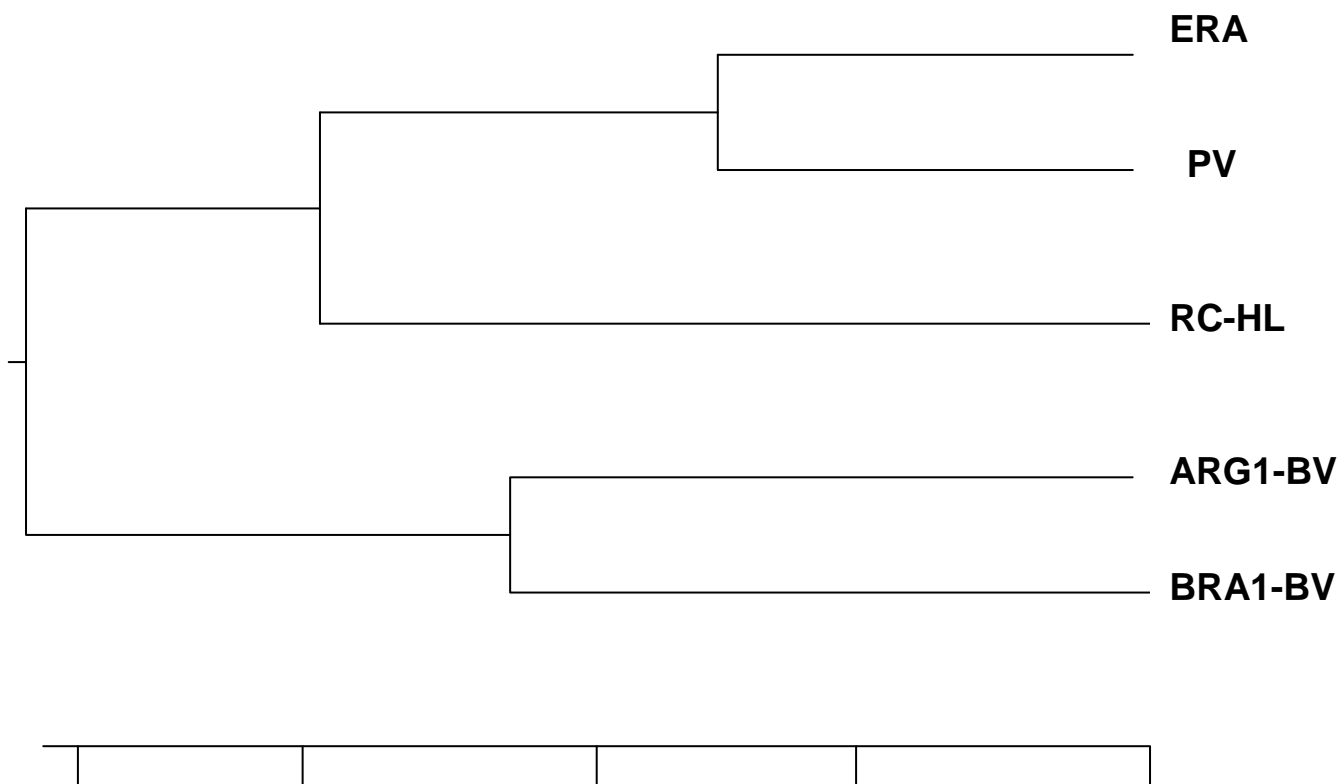
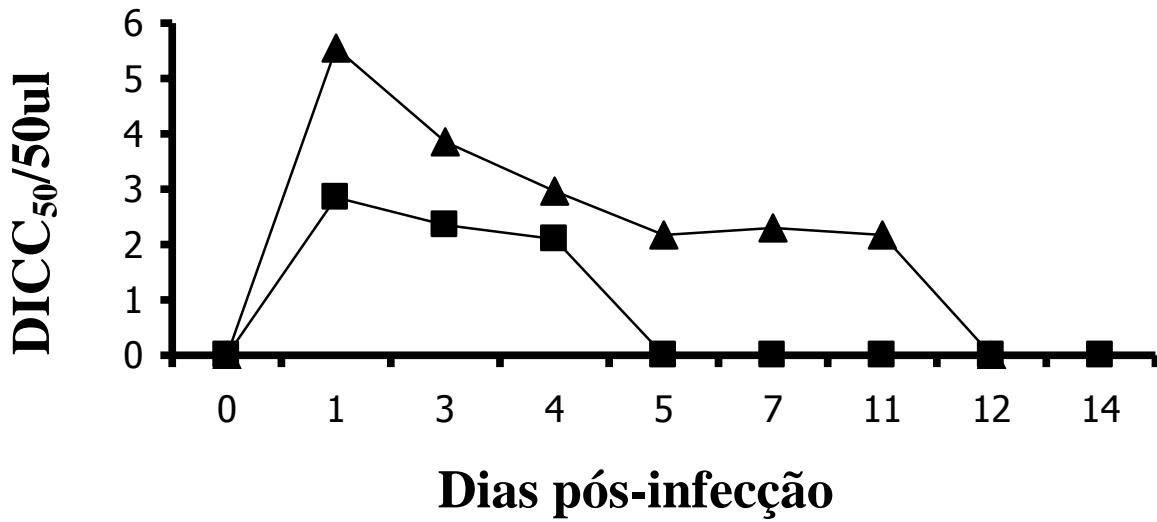


FIGURA 11**FIGURA 12**