

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

(22) Data de pedido: **2002.03.27**

(30) Prioridade(s): **2001.03.27 US 279173 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.01.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.05.06**
138/2009

(73) Titular(es):

UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN
120 VETERINARY ROAD SASKATOON,
SASKATCHEW.S7N 5E3 **CA**

(72) Inventor(es):

PHILIP WILLSON **CA**
QIANG LIU **CA**
SURESH K. TIKOO **CA**
LORNE A. BABIUK **CA**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS DE CULTURA DE CIRCOVÍRUS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Métodos de cultura de circovírus"

CAMPO TÉCNICO

O presente invento refere-se ao campo dos circovírus e proporciona composições e métodos de cultura de circovírus, nomeadamente circovírus porcino. Em particular, o presente invento refere-se a métodos de cultura de circovírus porcino em células de mamífero que expressam uma função de gene E1 de adenovírus de mamífero.

ANTERIORIDADE

Uma família de vírus denominada *Circoviridae*, presente numa gama de espécies vegetais e animais e habitualmente referida como circovírus, caracteriza-se por viriões redondos e sem invólucro com diâmetros médios entre 17 e 23,5 nm contendo ácido desoxirribonucleico em cadeia simples (ADNcs) e circular. O genoma de ADNcs dos circovírus representa os replicões de ADN viral mais pequenos que se conhecem. Tal como revelado em WO 99/45956, foram identificados pelo menos seis vírus como membros da família de acordo com o sexto relatório do comité internacional para a taxonomia de vírus (Lukert, P.D. et al. 1995, *The Circoviridae*, p. 166-168. Em F.A. Murphy, et al. (ed.) *Vírus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Arch. Virol. 10 Supl.).

Os vírus animais incluídos na família são o vírus da anemia de galinha (CAV); vírus da doença do bico e das penas (BFDV); circovírus porcino (PCV); e circovírus de pombo. O PCV foi originalmente isolado de culturas de células de rim porcino. O PCV replica no núcleo celular e produz corpos de inclusão intranucleares grandes. Consultar Murphy et al. (1999, *Circoviridae* p. 357-361, *Veterinary Virology*, 3ª ed. Academic Press, San Diego). Presentemente reconhecem-se dois tipos de PCV, PCV tipo 1 (PCV1) e PCV tipo 2 (PCV2). O PCV1, isolado como um contaminante persistente da linha celular contínua de rim porcino PK-15 (ATCC CCL31), não causa efeitos citopáticos detectáveis na cultura celular e não produz doença

clínica em porcos após infecção experimental (consultar Allan G., 1995, *Vet. Microbiol.* 44: 49-64; Tischer, I. et al., 1982, *Nature* 295: 64-66; e Tischer, I. et al., 1986, *Arch. Virol.* 91:271-276). O PCV2, contrariamente ao PCV1, está intimamente associado com a síndrome de atraso de crescimento multissistémico pós-desmame (PMWS) em porcos em desmame (consultar Allan G. et al., 1998, *Europe. J. Vet. Diagn. Investig.* 10:3-10; Ellis, J. et al., 1998, *Can. Vet. J.* 39:44-51 e Morozov, I. et al., 1998, *J. Clin. Microbiol.* 36:2535-2541). As sequências de nucleótidos de PCV1 são reveladas em Mankertz, A., et al. (1997, *J. Virol.* 71:2562-2566) e Meehan, B.M., et al. (1997, *J. Gen. Virol.* 78:221-227) e as sequências de nucleótidos de PCV2 são reveladas em Hamel, A.L. et al. (1998, *J. Virol.* 72:5262-5267); Mankertz, A. et al. (2000, *Virus Res.* 66:65-77) e Meehan, B.M. et al. (1998, *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179). Revelam-se estirpes de PCV2 em WO 00/01409 que foram depositadas em European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido e incluem: n.º de acesso V97100219; n.º de acesso V9700218; n.º de acesso V97100217; n.º de acesso V98011608; e n.º de acesso V98011609. WO 00/77216 também revela PCV2.

Os estudos publicados até hoje sobre o PCV2 utilizaram quer homogenatos de tecido, quer vírus cultivados derivados de isolados de campo. Tischer et al. (1987, *Arch Virol.* 96:39-57) relatam que as células de rim porcino são estimuladas para entrar na fase S do ciclo celular por tratamento com D-glucosamina. Contudo o tratamento deve ser efectuado cuidadosamente porque a D-glucosamina é tóxica para a cultura celular (consultar, Allan et al., (2000). *J. Vet. Diagn. Investigation.* 12:3-14). Continua a haver uma necessidade de métodos para cultivar circovírus, tais como por exemplo, PCV1 e PCV2 e outros circovírus de modo a obter circovírus puros. Tais métodos seriam vantajosos em particular para a preparação de antígenos PCV2 como vacinas dirigidas contra PMWS. O presente invento visa essa necessidade.

Todas as patentes e publicações são aqui incorporadas na sua totalidade.

DESCRIÇÃO DO INVENTO

O presente invento proporciona métodos de cultura de circovírus de mamífero incluindo: a) obter células de mamífero que expressam uma função E1 de adenovírus de mamífero, em que as referidas células são permissivas para replicação de circovírus de mamífero; b) introduzir o referido genoma de circovírus de mamífero ou uma sua parte capaz de replicação nas referidas células de mamífero; e c) cultivar as referidas células de mamífero sob condições adequadas para replicação do referido circovírus de mamífero. Nalgumas concretizações, o método inclui adicionalmente recuperar o referido circovírus das referidas células cultivadas.

Nalgumas concretizações, o circovírus de mamífero é circovírus porcino, tal como por exemplo, circovírus 1 porcino (PCV1) ou circovírus 2 porcino (PCV2). Ainda em concretizações adicionais, o circovírus porcino inclui uma sequência de nucleótidos quimérica. Noutras concretizações, as células de mamífero são de origem porcina. Ainda noutras concretizações, as células de mamífero são células de retina porcina.

Noutras concretizações, a função E1 de adenovírus de mamífero é a função E1 de adenovírus humano. Ainda noutras concretizações, a função E1 de adenovírus de mamífero é a função E1 de adenovírus porcino. Em concretizações adicionais, a função E1 é a função E1A e/ou E1B. Ainda em concretizações adicionais, a célula de mamífero que expressa a função E1 de mamífero é transformada estavelmente com sequências génicas E1 de mamífero. Noutras concretizações, a sequência do gene E1 de mamífero é heteróloga relativamente à referida célula de mamífero.

O presente invento também proporciona células de mamífero recombinantes que expressam uma função E1 de adenovírus de mamífero e inclui um genoma de circovírus de mamífero ou uma sua parte capaz de replicação e em que as referidas células são permissivas para a replicação do referido circovírus de mamífero. Nalgumas concretizações, o circovírus de mamífero é circovírus porcino tal como por exemplo, circovírus 1 porcino (PCV1) ou circovírus 2 porcino (PCV2). Ainda em concretizações adicionais, o circovírus porcino inclui uma sequência de

nucleótidos quimérica. Nalgumas concretizações, a função El de adenovírus é a função El de adenovírus humano. Noutras concretizações, a função El é a função El de adenovírus porcino. Noutras concretizações, a célula de mamífero é de origem porcina. Em concretizações adicionais, a célula de mamífero é uma célula de retina porcina. Ainda em concretizações adicionais, a célula de mamífero que expressa a função El de mamífero é transformada estavelmente com sequências do gene El de adenovírus de mamífero. Noutras concretizações, a sequência do gene El de mamífero é heteróloga relativamente à referida célula de mamífero.

O presente invento também proporciona métodos de preparação de uma célula recombinante de mamífero que expressa uma função El de adenovírus de mamífero e incluindo um genoma de circovírus de mamífero incluindo as etapas de, a) obter uma célula de mamífero que expressa uma função El de adenovírus de mamífero; e b) introduzir o referido genoma de circovírus de mamífero ou uma sua parte capaz de replicação na referida célula de mamífero. Em concretizações adicionais, o método inclui a etapa adicional de cultura da célula recombinante de mamífero sob condições adequadas para a replicação do referido circovírus de mamífero. Em concretizações adicionais, o método inclui recuperar o referido circovírus das referidas células cultivadas. Nalgumas concretizações, o circovírus de mamífero é circovírus porcino tal como por exemplo, circovírus 1 porcino (PCV1) ou circovírus 2 porcino (PCV2). Ainda em concretizações adicionais, o circovírus porcino inclui uma sequência de nucleótidos quimérica. Em concretizações adicionais as células de mamífero são de origem porcina. Ainda em concretizações adicionais as células de mamífero são células de retina porcina. Em concretizações adicionais, a função El de adenovírus é a função El de adenovírus humano ou a função El de adenovírus porcino. Ainda em concretizações adicionais, a célula de mamífero que expressa a função El de adenovírus de mamífero é transformada estavelmente com as sequências do gene El de adenovírus de mamífero. Noutras concretizações, a sequência do gene El de mamífero é heteróloga relativamente à referida célula de mamífero.

DESCRIÇÃO SUCINTA DAS FIGURAS

As figuras 1A-1B proporcionam a caracterização e titulação do vírus PCV2 gerado por transfecção de ADN e extracção a partir de células VIDO R1 infectadas pelo método Hirt. (A) PCR utilizando iniciadores específicos de PCV2 e ADN de células infectadas com PCV2 (pista 1) e com infecção simulada (pista 2). Utilizou-se um plasmídeo contendo o genoma de PCV2 como controlo (pista 3). Carregou-se a escada de ADN de 1 kb de GIBCO BRL na pista M. (B) Digeriu-se ADN viral de células infectadas com PCV2 (pistas 1, 3 e 5) e com infecção simulada (pistas 2, 4 e 6) com *NcoI* e *StuI* (pistas 1 e 2), *EcoRI* e *StuI* (pistas 3 e 4) e *EcoRI* e *EcoRV* (pistas 5 e 6). Carregou-se a escada de ADN 1-kb-plus da GIBCO BRL na pista M.

As figuras 2A-2B representam a titulação de PCV2 por coloração por imunoperoxidase. Às 72 h após infecção, incubaram-se células VIDO R1 com infecção simulada (A) ou infectadas com PCV2 (B) com anticorpo policlonal anti-ORF2 de ratinho e anticorpo secundário biotinilado. Após aplicação de um complexo de avidina e peroxidase de rábano biotinilada, revelou-se a monocamada com tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB). Uma célula escura resulta de infecção por uma partícula viral.

As figuras 3A-3C apresentam a sequência de nucleótidos (A) e a sequência de aminoácidos para ORF 1 (B) e ORF 2 (C) de circovírus porcino 2 (PCV2) tal como descrito no número de acesso no Genbank AF086834.

MELHOR FORMA DE REALIZAÇÃO DO INVENTO

O presente invento refere-se a composições e métodos para cultivar circovírus de mamífero, em particular circovírus porcino. O presente invento baseia-se na constatação de que uma célula porcina que expressa a função E1 humana era susceptível de ser transfectada com um genoma de vírus PCV2 e gerar vírus PCV2 com um título viral elevado. A linha celular VIDO R1, depositada na ATCC e com o número de acesso ATCC PTA-155, é uma linha celular de retina porcina transformada com E1 de adenovírus-5 humano (HAV5), que se demonstrou induzir a fase S do ciclo celular e efectuar activação *trans*

da transcrição. Consultar, Shenk, T. (1996). "Adenoviridae: the viruses and their replication" em Fields Virology. 3ª ed. B.N. Fields, D.M. Knipe e P.M. Howley (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, p. 2111-2148. Tal como aqui descrito no exemplo 3, transfectaram-se células VIDO R1 com um genoma de PCV2 e geraram-se vírus a 2×10^7 UI/ml.

A prática do presente invento emprega, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de microbiologia, imunologia, virologia, biologia molecular e de ADN recombinante que fazem parte dos conhecimentos dos peritos na especialidade. Estas técnicas estão completamente explicadas na literatura. Consultar, e.g., Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I e II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed. (1984)); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames e S. Higgins, ed. (1985)); *Transcription and Translation* (B. Hames e S. Higgins, ed. (1984)); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed. (1986)); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Ausubel, et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); e Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edição); vol. I, II e III (1989).

Os *Circoviridae*, uma família de vírus com viriões redondos e desprovidos de invólucro com diâmetros médios entre 17 a 23,5 nm contendo ADN em cadeia simples (ADNcs) e circular estão descritos no sexto relatório do comité internacional de taxonomia de vírus, anteriormente mencionado. Membros do grupo incluem os circovírus porcinos, PCV1 e PCV2. Sabe-se que alguns dos PCV são patogénicos, tais como PCV2, associado com PMWS.

Proporcionam-se sequências de nucleótidos para PCV1 em Mankertz, A., et al., 1997, *J. Virol.* 71:2562-2566 e Meehan, B.M. et al., 1997, *J. Gen. Virol.* 78:221-227. Proporcionam-se sequências de nucleótidos para PCV2 em Hamel, A.L. et al., 1998, *J. Virol.* 72:5262-5267; Mankertz, A. et al., 2000, *Virus Res.* 66:65-77 e Meehan, B.M. et al., 1998, *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179. Depositaram-se estirpes representativas de PCV2 em European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied

Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido e incluem o n.º de acesso V97100219; o n.º de acesso V9700218; o n.º de acesso V97100217; o n.º de acesso V98011608; e o n.º de acesso V98011609. WO 00/77216 também revela PCV2. As sequências de nucleótidos de PCV2 também foram publicadas em Hamel *et al.*, (1998), *J. Virol.* vol. 72, 6:5262-5267 (GenBank AF027217) e em Morozov *et al.*, (1998), *J. Clinical Microb.* vol. 36, 9:2535-2541, assim como GenBank AF086834; AF086835; e AF086836. A comparação entre as sequências de nucleótidos publicadas para PCV1 e PCV2 revela uma identidade <80%, apesar da organização genómica ser semelhante, especialmente no arranjo dos dois maiores quadros de leitura abertos (ORF) com uma origem de replicação de ADN putativa.

O presente invento abrange métodos de cultura de circovírus de mamífero e em particular, circovírus porcino (PCV). O presente invento abrange métodos de cultura de PCV incluindo as sequências de nucleótidos PCV aqui reveladas ou conhecidas na arte ou seus ORF ou partes destes que são capazes de replicação. O presente invento também abrange métodos de cultura de PCV com sequências de nucleótidos de PCV que diferem, devido à degenerescência do código genético, das aqui reveladas ou conhecidas na arte ou seus ORF ou suas partes capazes de replicação. O presente invento abrange adicionalmente métodos de cultura de PCV incluindo variações de sequências de nucleótidos de PCV que não alteram a funcionalidade ou especificidade da estirpe da sequência de nucleótidos ou seus ORF ou suas partes capazes de replicação. O presente invento também abrange métodos de cultura de PCV incluindo sequências de nucleótidos de PCV capazes de hibridar com as sequências aqui reveladas sob condições de rigor intermédio a elevado e métodos de cultura de PCV incluindo mutações da sequência de nucleótidos de PCV aqui revelada ou conhecida na arte, tais como deleções ou mutações pontuais ou seus ORF ou suas partes capazes de replicação. O presente invento também abrange métodos de cultura de PCV incluindo sequências de nucleótidos heterólogas. O presente invento abrange métodos de cultura de PCV incluindo sequências de nucleótidos de circovírus quiméricas tais como, por exemplo, sequências de nucleótidos de circovírus porcino em fusão com

sequências de nucleótidos de outros vírus patogénicos tais como vírus porcino patogénico, incluindo parvovírus.

Tal como aqui utilizada, uma sequência de nucleótidos heteróloga, relativamente a um circovírus ou a uma célula de mamífero, é aquela que não está normalmente associada com as sequências de circovírus como parte do genoma do circovírus ou aquela que não está normalmente associada com a célula de mamífero, respectivamente. Sequências de nucleótidos heterólogas incluem sequências sintéticas. As reacções de hibridação podem ser efectuadas sob condições de diferente "rigor". As condições que aumentam o rigor de uma reacção de hibridação estão amplamente conhecidas e publicadas na arte. Consultar, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989) na página 7.52. Exemplos de condições relevantes incluem (ordenadas por rigor crescente): temperaturas de incubação de 25°C, 37°C, 50°C e 68°C; concentrações de tampão de SSC 10X, SSC 6X, SSC 1X, SSC 0,1X (em que SSC é NaCl 0,15 M e tampão citrato 15 mM) e seus equivalentes utilizando outros sistemas tampão; concentrações de formamida de 0%, 25%, 50% e 75%; tempos de incubação desde 5 minutos a 24 horas; 1, 2 ou mais etapas de lavagem; tempos de incubação para lavagem de 1, 2 ou 15 minutos; e soluções de lavagem de SSC 6X, SSC 1X, SSC 0,1X ou água desionizada. Um exemplo de condições de hibridação rigorosas é 68°C e SSC 0,1X.

Os genomas de PCV codificam várias sequências de polipéptidos, numa gama de tamanho aproximado entre 8 e 35 kD. Considera-se um procedimento rotineiro a determinação de quadros de leitura abertos (ORF) para circovírus porcos utilizando utilitários padrão tal como por exemplo, MacVector® (Oxford Molecular Group Inc., MD 21030). O maior ORF, ORF1, dos dois tipos de PCV apresenta apenas variações insignificantes com uma identidade de 85% (tal como medida pelo programa Clustal) e demonstrou-se ser a proteína Rep em PCV1 (Mankertz, A., *et al.*, 1998, *J. Gen. Virol.* 79:381-384). Sem querer estar limitado pela teoria, uma taxa de variação mais elevada apresentada nas sequências ORF2 de PCV1 e PCV2 (identidade de cerca de 65%) sugeriria que as características de PCV específicas do tipo poderiam ser determinadas pela respectiva proteína ORF2. Mapearam-se vários epítomos de PCV específicos do tipo nas sequências ORF2 de PCV2. Consultar

Mahe, D. *et al.*, 2000, *J. Gen. Virol.* 81:1815-24. Noutro estudo recente, a ORF2 de PCV2 foi identificada como uma proteína estrutural principal que pode formar partículas virais do tipo cápside em células de insecto infectadas com ORF2 que expressa baculovírus recombinante. Consultar Nawagitgul, P. *et al.*, 2000, *J. Gen. Virol.* 81:2281-2287.

Nalgumas concretizações ilustrativas do invento aqui revelado, constrói-se um vector recombinante incluindo um genoma de PCV ou um seu ORF ou uma sua parte, tal como uma região antigénica por recombinação *in vitro* entre um plasmídeo e um genoma PCV. Nalgumas concretizações, o genoma PCV é um genoma PCV2. Noutras concretizações, constrói-se um vector recombinante incluindo um genoma PCV ou um seu ORF ou uma sua parte, tal como uma região antigénica por recombinação *in vivo*. São conhecidos na arte métodos de recombinação *in vivo* e incluem, por exemplo, os métodos revelados em Chartier, *et al.* (1996, *J. Virol.* 70:4805-4810). Vectores para construir genomas de circovírus incluem por exemplo, plasmídeos bacterianos que permitem a produção de cópias múltiplas da sequência de nucleótidos do circovírus clonado. Nalgumas concretizações, o plasmídeo é co-transfectado para uma célula hospedeira adequada para recombinação. As células hospedeiras adequadas para recombinação incluem qualquer célula que suporte recombinação entre um genoma PCV e um plasmídeo contendo sequências de PCV ou entre dois ou mais plasmídeos, cada um contendo sequências de PCV. A recombinação é geralmente efectuada em células procarióticas, tal como *E. coli* por exemplo, ao passo que a geração de circovírus é efectuada preferentemente em células de mamífero permissivas para replicação de PCV, tais como por exemplo células porcinas e em particular, células porcinas capazes de expressar a função E1 de adenovírus de mamífero.

O presente invento abrange a utilização de qualquer célula hospedeira de mamífero permissiva para replicação de circovírus e em particular, permissiva para replicação de PCV, tal como PCV1 e PCV2. Allan *et al.* (1995, *Veterinary Microbiology* 44: 49-64) relatam que o PCV replica em culturas de monócitos/macrófagos porcinas e bovinas. Tischer *et al.* (1987, *Arch. Virol.* 96:39-57) relatam que se sabe que o PCV necessita de células em divisão activa para replicação em

cultura celular. Os exemplos de células ou linhas celulares úteis para replicação de PCV incluem células de mamífero apresentando a função E1 e permissivas para replicação de PCV, incluindo células porcinas tais como células de monócitos/macrófagos porcinas e células de retina porcina que expressam a função E1 de adenovírus. Numa concretização ilustrativa aqui revelada, mostra-se que células de retina porcina que expressam a função E1 de adenovírus humano são permissivas para replicação de PCV2 e mostra-se que geram vírus a 2×10^7 UI/ml. Estão disponíveis linhas celulares porcinas de fontes acessíveis ao público tal como por exemplo American Type Tissue Collection (ATCC). O crescimento de culturas de células bacterianas, assim como a cultura e a manutenção de linhas de células eucarióticas e de células de mamífero são procedimentos bem conhecidos dos peritos na arte.

O presente invento abrange métodos de cultura de circovírus de mamífero, em particular, circovírus porcino em células hospedeiras de mamífero transfectadas com sequências génicas de E1 de adenovírus de mamífero. Nalgumas concretizações, a célula de mamífero é transformada estavelmente com sequências génicas de E1 de adenovírus. Nalgumas concretizações, as sequências génicas de E1 são integradas no genoma da célula de mamífero. Noutras concretizações, as sequências génicas de E1 estão presentes num plasmídeo de replicação. Ainda noutras concretizações, a sequência génica de E1 é heteróloga à célula de mamífero. Numa concretização ilustrativa aqui revelada transforma-se uma célula de mamífero porcina com uma sequência génica de E1 de adenovírus 5 humano. O presente invento abrange a utilização de qualquer célula de mamífero ou linha celular de mamífero que expressa a função E1 desde que a célula de mamífero ou a linha celular que expressa a função E1 seja permissiva para a replicação de circovírus, em particular circovírus porcino, tal como por exemplo, circovírus 1 porcino ou circovírus 2 porcino. Em concretizações preferidas, a célula de mamífero é uma célula porcina ou uma linha celular porcina. O presente invento abrange a utilização de qualquer função E1 de mamífero desde que a célula hospedeira de mamífero que expressa a função E1 de mamífero seja permissiva para replicação de circovírus, em particular PCV, tal como por exemplo, circovírus 1 porcino ou circovírus 2 porcino. Os genomas de

adenovírus de mamífero são conhecidos na arte e são revelados em, por exemplo, Reddy *et al.* (1998, *Journal of Virology*, 72:1394) que revela a sequência de nucleótidos, a organização do genoma e o mapa de transcrição do adenovírus 3 de bovino (BAV3); e Kleiboeker (1995, *Virus Res.* 36:259-268), que revela a região E1 de PAV-4. O presente invento abrange a função E1 de qualquer dos diferentes serotipos de adenovírus humano, tal como Ad2, Ad5, Ad12 e Ad40. Numa concretização ilustrativa aqui revelada no exemplo 1, a função E1 é a função E1 de Ad5 humano. O gene E1A humano é expresso imediatamente após infecção viral (0-2 horas) e antes de quaisquer outros genes virais. Flint (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 651:175-208; Flint (1986) *Advances Virus Research* 31:169-228; Grand (1987) *Biochem. J.* 241:25-38. O local de iniciação da transcrição de E1A de Ad5 é no nucleótido 498 e o local de iniciação ATG da proteína E1A é no nucleótido 560 do genoma viral. A proteína E1B funciona *em trans* e é necessária para o transporte de ARNm tardio do núcleo para o citoplasma. O promotor E1B de Ad5 consiste num único local de reconhecimento de afinidade elevada para Spl e caixa TATA. Nomeadamente, as sequências génicas de E1A e E1B de adenovírus humano 5 localizam-se nos nucleótidos 505-4034 da sequência de nucleótidos proporcionada em Chroboczek, J. *et al.* (1992, *Virology*. 186:280-285). Numa concretização ilustrativa aqui revelada nos exemplos, a célula hospedeira de mamífero é uma célula hospedeira porcina transfectada com sequências génicas E1 de adenovírus 5 humano.

O genoma de PCV pode ser isolado de viriões de PCV ou pode incluir um genoma PCV que foi inserido num plasmídeo, utilizando técnicas padrão de biologia molecular e biotecnologia. Descreve-se a clonagem do genoma PCV2 completo para o vector pBluescript II KS(+) de Strategene por PCR em Liu, *et al.* (2000, *J. Clin. Microbiol.* Vol. 38:3474-3477). O ADN genómico de PCV2 completo pode ser libertado do plasmídeo resultante por digestão com SacII.

A introdução de sequências de nucleótidos de circovírus em células hospedeiras de mamífero permissivas pode ser efectuada por qualquer método conhecido na arte, incluindo, entre outros, transfecção e transformação incluindo, entre outros, micro-injecção, electroporação, precipitação com CaPO₄, DEAE-dextrano, lipossomas, bombardeamento com partículas, etc.

Descreve-se aqui no exemplo 3 um método ilustrativo para transfectar sequências de nucleótidos de PCV2 para células VIDO R1.

Os métodos para cultura de células procarióticas, tais como células bacterianas, e células eucarióticas, tais como células hospedeiras de mamífero que expressam a função E1 de adenovírus são actualmente rotineiras para os peritos na arte.

Os seguintes exemplos são apresentados para ilustrar mas não limitam o invento. Todas as referências e publicações de patente aqui reveladas são aqui incorporadas na sua globalidade por referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação de células de retina porcina transfectadas com sequências de gene E1 de adenovírus humano (células VIDO R1)

As culturas primárias de células de retina embrionária porcina foram transfectadas com 10 µg de plasmídeo pTG4671 (Transgene, Estrasburgo, França) pela técnica de fosfato de cálcio. O plasmídeo pTG4671 contém as sequências E1A e E1B completas (nt 505-4034) de HAV-5, conjuntamente com o gene de puromicina-acetiltransferase como marcador seleccionável. Neste plasmídeo, a região E1 está sob controlo do promotor constitutivo do gene da fosfoglicerato-quinase de ratinho e o gene da puromicina-acetiltransferase é controlado pelo promotor precoce de SV40 constitutivo. Seleccionaram-se as células transformadas por três passagens em meio contendo puromicina a 7 µg/ml, identificaram-se com base na alteração da sua morfologia de um foco único (*i.e.*, perda de inibição de contacto) e sujeitaram-se a clonagem de célula única. A linha celular estabelecida foi primeiro ensaiada quanto à sua capacidade para sustentar crescimento de mutantes de deleção de E1 de HAV-5. Subsequentemente, a linha celular foi investigada adicionalmente quanto à presença de sequências E1 no genoma por PCR, expressão de proteínas E1A e E1B por transferência de *Western* e por tempo de duplicação em condições de cultura celular. Detectaram-se sequências E1 e demonstrou-se a produção de proteínas E1A e E1B por

imunoprecipitação. O tempo de duplicação foi mais curto comparativamente com o da linha celular parental.

Para avaliar a estabilidade da expressão de E1, cultivaram-se células VIDO R1 através de mais de 50 passagens (desdobramento 1:3 duas vezes por semana) e ensaiaram-se quanto à sua capacidade de sustentar a replicação de HAV-5 com deleção de E1. A expressão das proteínas E1A e E1B foi também monitorizada a intervalos de tempo regulares por transferência de *Western*. Os resultados indicaram que a linha VIDO R1 manteve a capacidade para sustentar crescimento de vírus com deleção de E1 e expressaram níveis semelhantes de proteínas E1 durante mais de 50 passagens em cultura. Assim, pode considerar-se que VIDO R1 é uma linha celular estabelecida. A linha celular VIDO R1 foi depositada em American Type Culture Collection (ATCC) e tem o número de acesso ATCC PTA-155.

Exemplo 2

O exemplo 2 proporciona uma descrição da clonagem molecular do genoma PCV2 completo.

Inicialmente, o ADN de PCV2 foi amplificado por PCR a partir de ADN total extraído de um leitão com PMWS. A clonagem do ADN genómico completo de PCV2 para o vector pBluescript II KS(+) (Stratagene) por reacção de polimerização em cadeia (PCR) foi descrito por Liu et al. (2000). *J. Clin. Microbiol.* 38:3474-3477). A sequência de PCV2 foi submetida a GeneBank (N.º de acesso AF086834). O ADN genómico completo de PCV2 é libertado do plasmídeo resultante por digestão com SacII.

Exemplo 3

O exemplo 3 descreve a transfecção de células VIDO R1, tal como descrito no Exemplo 1, com um plasmídeo contendo o genoma de PCV2 tal como construído no exemplo 2.

Materiais e métodos

Cultura celular

Mantiveram-se a linha celular de retina porcina fetal, VIDO R1, tal como descrito no exemplo 1 e células Vero (ATCC) a 37°C com CO₂ a 5% em meio MEM baseado em Eagle suplementado

com soro fetal bovino (FBS) inactivado por calor a 10% ou 5%, respectivamente.

Transfecção e infecção

Transfectaram-se monocamadas de células VIDO R1 cultivadas numa placa de seis poços com ADN PCV2 clonado utilizando Lipofectin de acordo com as recomendações do fabricante (GIBCO BRL). Antes da transfecção, libertou-se o genoma completo PCV2 do plasmídeo por digestão com *SacII* (Liu, Q., et al., 2000, *J. Clin. Microbiol.* 38:3474-3477). Para infecção, as células VIDO R1 transfectadas foram sujeitas a três ciclos de congelação (-70°C) e descongelamento (37°C). O lisado foi então clarificado por centrifugação e utilizado para infectar células VIDO R1 frescas. Em relatos publicados, utiliza-se uma linha celular de rim porcino isenta de PCV1 para cultura de vírus PCV2. Para estimular a entrada em fase S no ciclo celular, as células de rim porcino são sempre tratadas com D-glucosamina (consultar Tischer et al., (1987). *Arch Virol.* 96:39-57.). Contudo, o tratamento deve ser efectuado com cuidado porque a D-glucosamina é tóxica para a cultura celular (consultar Allan et al., (2000). *J. Vet. Diagn. Investigation.* 12:3-14). Contrariamente, dado que a linha celular VIDO R1 utilizada neste estudo foi transformada com HAVS-E1 que pode induzir a fase S, o tratamento com D-glucosamina não foi necessário.

Exemplo 4

Purificação e titulação de vírus

Para a purificação de vírus PCV2, incubaram-se células VIDO R1 infectadas com PCV2 com Triton X-114 a 0,5% em solução salina tamponada de fosfato (PBS) a 37°C durante 45 min seguido por extracção com Freon 113 (1,1,2-tricloro-trifluoroetano). Os resíduos celulares e membranas foram clarificados por centrifugação a 2000 g durante 15 min. Os vírus no sobrenadante foram sedimentados a 35 000 g durante 3h através de uma almofada de sacarose a 20%. O sedimento de vírus foi suspenso em PBS e armazenado a -70°C. Os títulos de vírus foram determinados como unidades infecciosas (UI) por coloração quantitativa de proteína ORF2 com imunoperoxidase.

Para este propósito, infectaram-se as monocamadas celulares em placas de 12 poços com diluições em série de vírus. Após adsorção de vírus durante 1 h, as células foram lavadas e tapadas com MEM contendo FBS a 2% e agarose a 0,7%. No dia 3 após infecção (p.i.), a camada de agarose foi removida e fixaram-se e permeabilizaram-se as células com metanol/acetona (1:1 em volume) durante 20 min a -20°C. Após bloqueio com albumina de soro bovino a 1% durante 1 h à temperatura ambiente, as células foram incubadas com soro anti-ORF2 de coelho (Liu *et al.*, 2001, *Protein Expression and Purification*. 21:115-120). Após incubação durante 2 h, as placas foram lavadas com PBS e seguidamente processadas utilizando o *kit* VECTASTAIN Elite ABC (Vector Laboratories). A reacção foi revelada com tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e observada ao microscópio. Por contagem das células coradas positivamente, o título de vírus foi expresso em UI em que 1 UI foi definida como uma célula/foco corada positivamente a 3 d.p.i.

Extracção e caracterização de ADN viral

O ADN viral foi extraído de monocamadas de células VIDO RI infectadas com PCV2 pelo método de Hirt (1967, *J. Mol. Biol.* 26:365-369). O ADN viral foi então caracterizado por análise de restrição e reacção de polimerização em cadeia (PCR) tal como descrito em Liu *et al.*, (2000). *J. Clin. Microbiol.* 38:3474-3477).

Amplificou-se um produto de tamanho específico por PCR utilizando ADN extraído de células infectadas como molde e iniciadores específicos de PCV-2, enquanto não foi amplificado qualquer ADN a partir de células de controlo, não infectadas. As digestões de ADN viral com NcoI e StuI, de forma consistente com os padrões de restrição esperados, resultaram em dois fragmentos de 1291 pb e 477 pb de tamanho, respectivamente; a digestão com EcoRI e StuI produziu dois fragmentos de 1492 pb e 276 pb de tamanho, respectivamente; e a digestão com EcoRI e EcoRV gerou dois fragmentos de 1094 pb e 674 pb de tamanho, respectivamente. Os dados indicam que se obteve o vírus PCV2. Utilizando um ensaio de imunocoloração e por contagem das células que coraram positivamente,

determinou-se o título de vírus desta preparação como sendo 2×10^7 UI/ml.

Lisboa, 2009-07-13

REIVINDICAÇÕES

1. Método para cultura de um circovírus de mamífero compreendendo:

- a) obter células de mamífero que expressam uma função E1 de adenovírus de mamífero, em que as referidas células são permissivas para replicação de circovírus de mamífero;
- b) introduzir o genoma de circovírus de mamífero, ou uma sua parte capaz de replicação, nas referidas células de mamífero; e
- c) cultivar as referidas células de mamífero em condições adequadas para replicação do referido circovírus de mamífero.

2. Método para replicação de um circovírus de mamífero compreendendo a cultura de uma célula de mamífero que compreende um genoma de circovírus de mamífero, ou uma sua parte capaz de replicação, em condições adequadas para replicação do referido circovírus de mamífero, em que a célula de mamífero expressa uma proteína funcional E1 de adenovírus de mamífero e é permissiva para replicação de circovírus de mamífero.

3. Método da reivindicação 1 ou 2, em que o referido circovírus de mamífero é circovírus porcino.

4. Método de preparação de uma célula recombinante de mamífero compreendendo uma função E1 de adenovírus de mamífero e um genoma de circovírus porcino compreendendo as etapas de a) obter uma célula de mamífero que expressa uma função E1 de adenovírus de mamífero; e b) introduzir o referido genoma de circovírus porcino, ou uma sua parte capaz de replicação, na célula de mamífero.

5. Método de preparação de uma célula recombinante de mamífero compreendendo a introdução de uma região do gene E1 de adenovírus de mamífero numa célula de mamífero que compreende um genoma de circovírus de mamífero, ou uma sua parte capaz de replicação, em que a célula é permissiva para replicação do circovírus de mamífero.

6. Método da reivindicação 4 ou 5 compreendendo adicionalmente a etapa de cultura da referida célula

recombinante de mamífero em condições adequadas para a replicação do referido circovírus porcino.

7. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 6 compreendendo adicionalmente recuperar o referido circovírus das referidas células cultivadas.

8. Método de qualquer uma das reivindicações 3 a 7 em que o referido circovírus porcino é circovírus porcino de tipo 2.

9. Método de qualquer uma das reivindicações 3 a 7 em que o referido circovírus porcino é circovírus porcino de tipo 1.

10. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores em que as referidas células de mamífero são de origem porcina.

11. Método da reivindicação 10, em que as referidas células de mamífero são células de retina porcina.

12. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores em que a referida função E1 de adenovírus de mamífero é a função E1 de adenovírus humano.

13. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 11 em que a referida função E1 de adenovírus de mamífero é a função E1 de adenovírus porcino.

14. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores em que as referidas células de mamífero que expressam a função E1 de adenovírus de mamífero são transformadas estavelmente com uma sequência do gene E1 de adenovírus de mamífero.

15. Método da reivindicação 14 em que a referida sequência do gene E1 de adenovírus de mamífero é heteróloga para a referida célula de mamífero.

16. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores em que a referida função E1 é função a E1A e/ou E1B.

17. Método de qualquer uma das reivindicações 3 a 16 em que o referido circovírus porcino compreende uma sequência de nucleótidos quimérica.

18. Célula recombinante de mamífero que expressa uma função E1 de adenovírus de mamífero e compreende um genoma de circovírus porcino, ou uma sua parte capaz de replicação, e em que a referida célula é permissiva para a replicação do referido circovírus porcino.

19. Célula recombinante de mamífero da reivindicação 18 em que a referida função E1 de adenovírus é a função E1 de adenovírus humano.

20. Célula recombinante de mamífero da reivindicação 18 em que a referida função E1 de adenovírus é a função E1 de adenovírus porcino.

21. Célula recombinante de mamífero de qualquer uma das reivindicações 18 a 20 em que a referida célula é de origem porcina.

22. Célula recombinante de mamífero da reivindicação 21 em que a referida célula é uma célula de retina porcina.

23. Célula recombinante de mamífero de qualquer uma das reivindicações 18 a 22 em que a célula de mamífero que expressa a função E1 de adenovírus de mamífero é transformada estavelmente com uma sequência do gene E1 de adenovírus de mamífero.

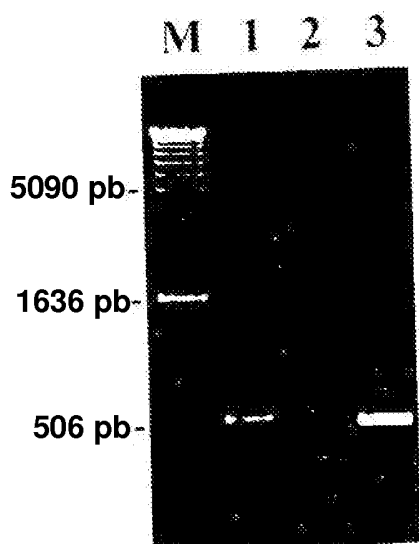
24. Célula recombinante de mamífero da reivindicação 23 em que a referida sequência do gene E1 é uma sequência do gene E1 de adenovírus humano.

25. Célula recombinante de mamífero da reivindicação 23 em que a referida sequência do gene E1 de adenovírus de mamífero é heteróloga relativamente à referida célula de mamífero.

Lisboa, 2009-07-13

RESUMO

"Métodos de cultura de circovírus"



O presente invento refere-se a métodos de cultura de circovírus e em particular, circovírus porcino. O presente invento proporciona composições e métodos de cultura de circovírus porcino em células de mamífero que expressam a função E1 de adenovírus de mamífero.

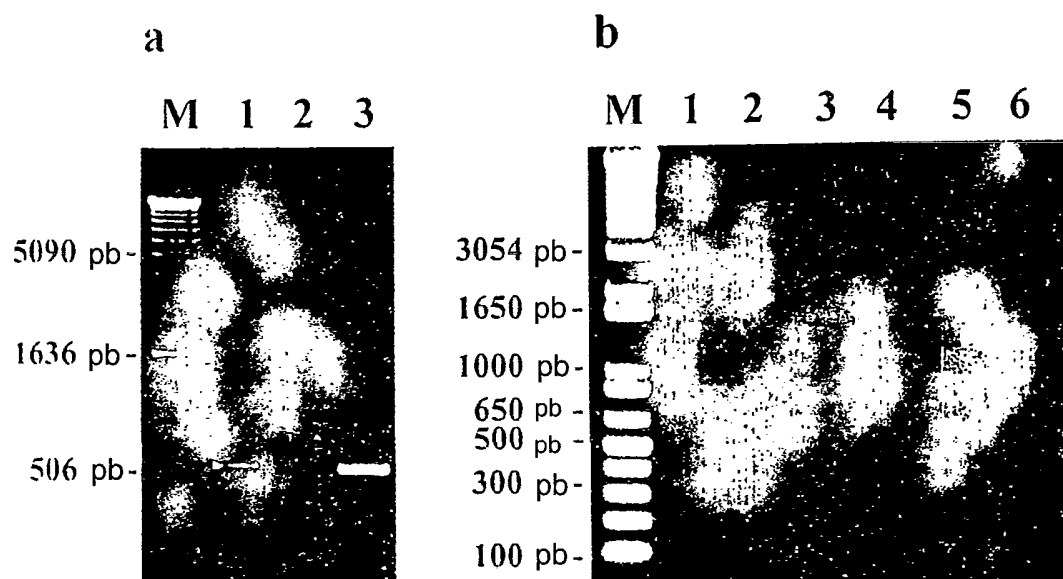


FIG. 1A-1B

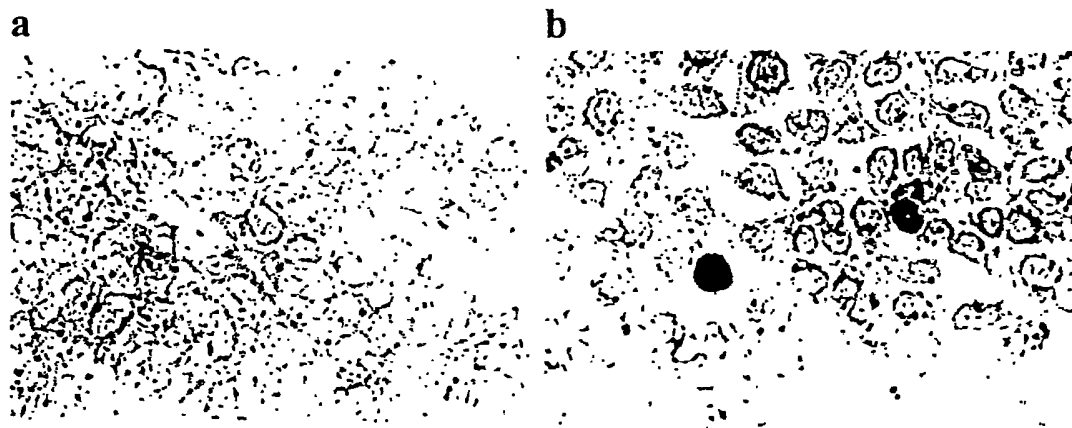


FIG. 2A-2B

```

1  accagcgcac  ttccggcagcg  gcagcacctc  ggcaacacct  cagcagcaac  atgcccagca
61  agaagaatgg  aagaagcggg  cccaaccac  ataaaagggtg  ggtgttcacg  ctgaataatc
121  cttccgaaga  cgagcgcaag  aaaatacggg  agctcccaat  ctccctatct  gattatttta
181  ttgtttggcg  ggagggtaat  gaggaaggac  gaacacctca  cctccagggg  ttcgctaatt
241  ttgtgaagaa  gcaaactttt  aataaagtga  agtgggtattt  ggggtgcccgc  tgccacatcg
301  agaaagccaa  aggaactgat  cagcagaata  aagaatattg  tagtaaagaa  ggcaacttac
361  ttattgaatg  tggagctcct  cgatctcaag  gacaacggag  tgacctgtct  actgctgtga
421  gtaccttggt  ggagagcggg  attctggtga  ccgttgcaaa  gcagcacctc  gtaacgtttg
481  tcaaaaatct  ccgcgggctg  gctgaacttt  tgaaagtgag  cgggaaaatg  caaaagcgtg
541  attggaaaac  caatgtacac  ttcatgtgtg  ggccacctgg  gtgtggtaaa  agcaaatggg
601  ctgctaattt  tgcaaacccg  gaaaccacat  actggaaacc  acctaaaaac  aagtgggtgg
661  atggttacca  tgggtgaaaa  gtggttgtta  ttgatgactt  ttatggctgg  ctgccgtggg
721  atgatctact  gagactgtgt  gatcgatata  cattgactgt  aaaaactaaa  ggtggaactg
781  tacctttttt  ggcccgagct  attctgatta  ccagcaatca  aaccccgctg  gaatgggtact
841  cctcaactgc  tgtcccagct  gtagaagctc  tctatcggag  gattacttcc  ttgggtattt
901  ggaagaatgt  tacagaacaa  tccacggagg  aagggggcca  gtttgtcacc  ctttcccccc
961  catgccctga  atttccatat  gaaataaatt  actgagtctt  ttttatcact  tcgtaatggg
1021  ttttattatt  catttagggg  ttaagtgggg  ggtctttaag  attaaattct  ctgaattgta
1081  catacatggg  tacacggata  ttgtagtctt  ggtcgtattt  actgttttcg  aacgcagtgc
1141  cgaggcctac  gtgggtccaca  tttctagagg  tttgtagcct  cagccaaagc  tgattccttt
1201  tgttattttg  ttggaagtaa  tcaatagtgg  agtcaagaac  aggtttgggt  gtgaagtaac
1261  gggagtggta  ggagaagggg  tgggggattg  tatggcggga  ggagtagttt  acatatgggt
1321  cataggttag  ggctgtggcc  tttgttacia  agttatcatc  tagaataaca  gcagtggagc
1381  ccactcccc  atcacccctg  gtgatggggg  agcaggggca  gaattcaacc  ttaacctttc
1441  ttattctgta  gtattcaaag  ggtatagaga  ttttgttggt  cccccctccc  gggggaacaa
1501  agtcgtcaat  attaaatctc  atcatgtcca  ccgcccagga  gggcggtgtg  actgtggtag
1561  ccttgacagt  atatccgaag  gtgcgggaga  ggcgggtgtt  gaagatgcca  tttttccttc
1621  tccaacggtg  gcggtggcgg  ggggtggacg  gccaggggcg  gcggcgagg  atctggccaa
1681  gatggctgcg  ggggcgggtg  cttcttctgc  ggtaacgcct  ccttggtatc  gtcatagtcg
1741  aaaacgaaag  aagtgcgctg  taagtatt

```

FIG. 3A

MPSKKNRSGPQPHKRWFVTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFI
VGEEGNEEGRTPHLQGFANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQQNKEYCSKEGN
LLIECGAPRSQGQRSDLSTAVSTLLESGILVTVAQHVPVTFVKNFRGLAELLKVSGKM
QKRDWKTNVHFIVGPPGCGKSKWAANFANPETTYWKPPKNKWWDGYHGEKVVIDDFY
GWL PWDDLRLCDRYPLTVKTKGGTVPF LARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYR
RITSLVFWKNVTEQSTEEGGQFVTLSPPCPEFPYEINY"

FIG. 3B

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL VHPRHRYRWRKNGI
FNTRL SRTFGYTVKATTVTTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVK
VEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFSYHSRY
FTPKPVL DSTIDYFQPNKNRNQLWLRLQTSRNV DHVGLGTAFENSKYDQDYNIRVTMY
VQFREFNLKDPPLKP"

FIG. 3C