



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

(11) PI 0508928-0 B1

(22) Data do Depósito: 05/04/2005

(45) Data de Concessão: 06/10/2015
(RPI 2335)



(54) Título: PROCESSO DE FALICITAÇÃO DA INFECÇÃO DE UMA CÉLULA DE VERTEBRADO POR PRRSV E PARA MEDIR A PROPENSÃO DE UMA LINHAGEM DE CÉLULAS TESTE À REFERIDA INFECÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 39/12; C12Q 1/68; C12N 7/00; C12N 5/06; C12N 15/86

(30) Prioridade Unionista: 23/04/2004 US 60/565,214, 09/12/2004 US 60/634,736

(73) Titular(es): ZOETIS P&U LLC

(72) Inventor(es): JAY GREGORY CALVERT, DAVID EWELL SLADE, SIAO-KUN WAN WELCH

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO DE FACILITAÇÃO DA INFECÇÃO DE UMA CÉLULA DE VERTEBRADO POR PRRSV E PARA MEDIR A PROPENSÃO DE UMA LINHAGEM DE CÉLULAS TESTE À REFERIDA INFECÇÃO**".

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos e composições relacionados à produção de células hospedeiras permissivas ao crescimento de vírus das famílias *Asfarviridae* e *Arteriviridae*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 *Asfarviridae*

Asfarviridae é uma família de vírus envelopados icosaédricos cujo genoma consiste em uma única molécula de DNA de filamento duplo linear de aproximadamente 150000–190000 nucleotídeos de comprimento. O nome da família é derivado dos Vírus da Febre Suína Africana e Relacionados (**A**frican **S**wine **F**ever **A**nd **R**elated Viruses). O Vírus da Febre Suína Africana (ASFV) é o tipo de espécie do gênero *Asfivirus* e é o único membro da família. Recentemente, tem sido sugerido por implicação que o polipeptídeo suíno CD163 é o receptor celular para o Vírus da Febre Suína Africana (ASFV) (Sanchez-Torres e outros, 2003)

20 *Arteriviridae*

Os vírus da família de *Arteriviridae* incluem o vírus da arterite eqüina (EAV), o vírus de aumento da lactato desidrogenase (LDV) e o vírus da febre hemorrágica de símios (SHFV). O Arterivírus que possui a maior importância econômica é o Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV).

PRRSV

A Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS) é uma das doenças dos suínos mais importantes economicamente. A síndrome surgiu quase que simultaneamente na América do Norte e na Europa Oriental no final dos anos 80 e se espalhou se tornando endêmica nas principais nações produtoras de suínos da Europa, Ásia e Américas. O agente etiológico da PRRS é um vírus que foi denominado de vírus PRRS ou PRRSV. Tan-

to para a PRRS da Europa quanto da América do Norte, a doença é caracterizada pela falha reprodutiva em porcas e leitoas (abortos tardios, abortos e múmias), alta mortalidade entre as porcas em amamentação e doença respiratória nos suínos de todas as idades. A doença tem sido assunto de revisões recentes (Mengeling e Lager, 2000; Murtaugh e outros, 2002; Nodelijk, 2002; Plagemann, 2003).

No porco, a infecção pelo PRRSV é limitada a um subconjunto de células da linhagem de monócitos/macrófagos. As células de macrófagos alveolares suínos (PAM) completamente diferenciadas são as células alvo primárias para a replicação viral (Duan e outros, 1997a; Duan e outros, 1997b). A imortalização de células PAM é um desafio técnico e quando bem-sucedida, resultou em linhagens de células que não são permissivas para o crescimento do vírus PRRS (Weingartl e outros, 2002). Os vírions de PRRS são ligados especificamente pelos macrófagos e internalizados em fossos revestidos com clatrina pela endocitose. A liberação de vesículas endocíticas requer pH ácido (Nauwynck e outros, 1999). A ligação inicial dos vírions é mediada pela interação da proteína de matriz viral com glicosaminoglicanas de sulfato de heparina (Delputte e outros, 2002). A internalização pode ser facilitada por uma glicoproteína de membrana de 210 ou 220 kDa, uma vez que a incubação de células PAM com anticorpos monoclonais para este polipeptídeo bloqueia a infecção com o vírus PRRS (Duan e outros, 1998; Wisink e outros, 2003). A glicoproteína de 210 kDa foi recentemente identificada como sialoadesina, um membro da família siglec das lectinas similares à imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (Pensaert e outros, 2003). A transfecção da linhagem de células PK-15 (de rins de porco) não permissivas com a sialoadesina suína conferiu a capacidade de internalizar as partículas de PRRSV, mas permanecia um bloqueio evidente no estágio não revestido, uma vez que os vírions entraram nas vesículas celulares, mas não sofreram desintegração dos nucleocapsídeos e fusão de membrana da vesícula. Os genes virais não eram expressos e as células PK-15 transfectadas não foram tornadas permissivas para o vírus PRRS (Vanderheijden e outros, 2003). Para o conhecimento dos presentes inventores, a transfecção com a

sialoadesina não mostrou ser suficiente para converter qualquer linhagem de células não permissiva ao PRRSV para o fenótipo permissivo para PRRSV.

Além das células suínas primárias da linhagem de monócitos/macrófagos, o único outro tipo celular conhecido como sendo permissivo para o crescimento de PRRSV em cultura de célula é a linhagem de células de rim de macaco imortalizada MA-104 (Chladek e outros, 1998) e derivados tais como MARC-145 (Kim e outros, 1993) e CL-2621. Não se sabe porque esta única linhagem de células particular é permissiva, ainda outras linhagens de células de mamíferos não são. O vírus PRRS se liga especificamente a vários tipos de células diferentes, mas não inicia a infecção (Kreutz, 1998; Therrien e outros, 2000). Nas células MARC-145, a internalização do vírus por endocitose e a retirada do revestimento subsequente em vesículas com pH baixo parecem imitar eventos similares nas células PAM (Kreutz e Ackermann, 1996). Entretanto, vários anticorpos monoclonais que se ligam à sialoadesina suína falham na detecção de uma proteína homóloga na superfície de células MARC-145 (Duan e outros, 1998; Wissink e outros, 2003), sugerindo que as células MARC-145 podem utilizar um membro divergente da mesma família de proteínas ou um receptor completamente diferente.

As vacinas atuais para PRRSV são propagadas em linhagens de células de símios, o que é uma atividade potencialmente perigosa. O uso de linhagens de células de símios para a produção de vacinas possui o potencial de introduzir vírus de primatas significativos nas linhagens suínas pretendidas para as finalidades de xenotransplante. Devido ao fato de que os suínos estão sendo crescentemente explorados como uma fonte de órgãos xenotransplantados para seres humanos, a introdução de linhagens de células de primatas nas populações suínas pode em última análise apresentar um risco para os seres humanos que recebem órgãos xenotransplantados. Assim, seria prudente evitar o uso de linhagens de células de símios nas preparações de vacinas. Seria, portanto, desejável identificar ou gerar células ou linhagens de células sem ser de símios capazes de sustentar a replicação do PRRSV. Para esta finalidade, é essencial identificar o(s) produto(s) gênico(s) que pode(m) ser responsável(is) por conferir a permissividade para

a replicação do PRRSV como observado em certas linhagens de células de símios assim como nas células PAM. Uma vez que tais produtos gênicos são identificados, as células não permissivas poderiam ser tornadas permissivas através da transfecção do gene essencial nas memsas, fornecendo assim um arranjo mais amplo de linhagens de produção para uma vacina.

Um laboratório relatou que a proteína tetraspanina CD151 das células MARC-145, quando transfectada nas células BHK-21 não permissivas, confere permissividade ao vírus PRRS (Kapil e Shanmukhappa, 2003; Shanmukhappa e Kapil, 2001). Esta observação ainda tem que ser confirmada por um laboratório independente.

É descrito aqui um polipeptídeo não relacionado, que quando transfectado em células não permissivas, confere permissividade ao vírus PRRS.

Referências Citadas

Chladek, D. W., Harris, L. L. e Gorcyca, D. E. Method of growing and attenuating a viral agent associated with mystery swine disease. Boehringer Ingelheim Animal Health, Inc. 677,585[US 5,840,563], 1-24. 11-24-1998. USA. 7-9-1996. Tipo de Referência: Patente

Dea,S., Gagnon,C.A., Mardassi,H., Pirzadeh,B. e Rogan,D. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates [Review]. Arch. Virol. 145, 659-688.

Delputte,P.L., Vanderheijden,N., Nauwynck,H.J. e Pensaert, M.B. (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. J. Virol. 76, 4312-4320.

Duan,X., Nauwynck,H.J. e Pensaert,M.B. (1997a). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Arch. Virol. 142, 2483-2497.

Duan,X., Nauwynck,H.J. e Pensaert,M.B. (1997b). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues

of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9-19.

Duan,X.B., Nauwynck,H.J., Favoreel,H.W. e Pensaert,M.B. (1998). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 72, 4520-4523.

Graversen,J.H., Madsen,M. e Moestrup,S.K. (2002). CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. [Review] [19 refs]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 309-314.

Gronlund J. Vitved L. Lausen M. Skjodt K. Holmskov U. Cloning of a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule (M160) expressed by human macrophages. *Journal of Immunology* 165(11):6406-6415, 2000.

Kapil, S. e Shanmukhappa, K. Host susceptibility factor(s) for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and uses in swine breeding, as a target for antiviral compounds e development of a non-simian recombinant cell line for propagation of the virus. none. US 2003/0186236 A1, 1-45. 10-2-2003. USA. 1-28-2002. Tipo de Referência: Patente

Kim,H.S., Kwang,J., Yoon,I.J., Joo,H.S. e Frey,M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogenous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.

Kreutz,L.C. (1998). Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism. *Virus Res.* 53, 121-128.

Kreutz,L.C. e Ackermann,M.R. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 42, 137-147.

Mengeling,W.L. e Lager,K.M. (2000). A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Research* 31, 61-69.

Meulenberg,J.J.M. (2000). PRRSV, the virus. *Veterinary Research* 31, 11-21.

Murtaugh,M.P., Xiao,Z.G. e Zuckermann,F. (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [Review]. *Viral Immunology* 15, 533-547.

Nauwynck,H.J., Duan,X., Favoreel,H.W., Van Oostveldt,P. e Pensaert,M.B. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 80, 297-305.

10 Nodelijk,G. (2002). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis - A review [Review]. *Vet. Quart.* 24, 95-100.

Pensaert, M., Nauwynck, H. e Vanderheijden, N. Nucleic acid encoding polypeptide involved in cellular entrance of the PRRS virus. Akzo Nobel N.V. e Universiteit Gent. WO 03/010200 A2, 1-24. 2-6-2003. 7-18-2002. Tipo de Referência: Patente

20 Philippidis,P., Mason,J.C., Evans,B.J., Nadra,I., Taylor,K.M., Haskard,D.O. e Landis,R.C. (2004). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis - Antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo e after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation Research* 94, 119-126.

Plagemann,P.G.W. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Origin hypothesis. *Emerging Infectious Diseases* 9, 903-908.

25 Ritter,M., Buechler,C., Langmann,T. e Schmitz,G. (1999). Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 260, 466-474.

30 Sanchez-Torres,C., Gomez-Puertas,P., Gomez-del-Moral,M., Alonso,F., Escribano,J.M., Ezquerro,A. e Dominguez,J. (2003). Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch. Virol.* 148, 2307-2323.

Shanmukhappa,K. e Kapil,S. (2001). Cloning and identification of MARC-145 cell proteins binding to 3'UTR and partial nucleoprotein gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494, 641-646.

- 5 Snijder,E.J. e Meulenberg,J.J.M. (2001). Arteriviruses. In *Fields Virology*, D.M.Knipe, P.M.Howley, D.E.Griffin, M.A.Martin, R.A.Lamb, B.Roizman e S.E.Straus, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1205-1220.

- 10 Therrien,D., St Pierre,Y. e Dea,S. (2000). Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells. *Arch. Virol.* 145, 1099-1116.

- 15 Vanderheijden,N., Delputte,P.L., Favoreel,H.W., Vandekerckhove,J., Van Damme,J., van Woensel,P.A. e Nauwynck,H.J. (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207-8215.

- 20 Weingartl,H.M., Sabara,M., Pasick,J., van Moorlehem,E. e Babiuk,L. (2002). Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages - Partial characterization and virus susceptibility. *J. Virol. Methods* 104, 203-216.

Wissink,E.H.J., van Wijk,H.A.R., Pol,J.M.A., Godeke,G.J., van Rijn,P.A., Rottier,P.J.M. e Meulenberg,J.J.M. (2003). Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch. Virol.* 148, 177-187.

25 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

- 30 A invenção inclui um método para facilitar a infecção de uma ou mais células por um vírus que é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae* e *Asfarviridae*, que compreende a etapa de direcionamento da maior expressão de um polipeptídeo CD163 dentro da dita célula. Em uma modalidade preferida, o CD163 é ligado à membrana. Em uma modalidade, o vírus é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae*. Em uma modalidade preferida o vírus é PRRSV. Em uma outra modalidade, o dito vírus é o vírus

da arterite eqüina (EAV). Ainda em uma outra modalidade, o dito vírus é o Vírus da Febre Suína Africana (ASFV).

A maior expressão de um polipeptídeo CD163 pode ser conseguida através de métodos tais como a introdução de ácidos nucleicos exógenos que codificam polipeptídeos CD163. Tais métodos incluem, mas não estão limitados à transfecção, à eletroporação e à fusão com um veículo de um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163. A maior expressão pode ser também conseguida através da indução da expressão de CD163 exógeno através de tratamento químico.

O método pode transformar células previamente não permissivas para o PRRSV em permissivas para PRRS. O método pode ainda incluir a transformação de uma ou mais células que anteriormente não expressavam um polipeptídeo CD163 em células que são induzidas a expressarem um polipeptídeo CD 163.

As células em uma modalidade preferida são células de animais. Estas podem ser células de vertebrados ou de invertebrados. As células podem ser de mamíferos. As células ou a linhagem de células pode ser uma linhagem de células de inseto. As células podem ser células BHK21. As células podem ser derivadas de células de rim suínas. As células ou a linhagem de células pode ser derivada de células de rim de felinos. As células ou a linhagem de células pode ser, mas não está limitada às células BHK-21, NLST-1, NLFK-1, Vero ou RL. O PRRSV pode ter o genótipo Europeu ou norte-americano.

Como observado anteriormente, a maior expressão de um polipeptídeo CD163 pode ser conseguida através de métodos que incluem, mas não estão limitados à: transfecção, eletroporação e fusão com um veículo de um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163. Quaisquer polipeptídeos CD163 são considerados. Os que contêm uma região transmembrana são preferidos. Os exemplos de polipeptídeos CD163 são selecionados do grupo que consiste nos polinucleotídeos listados abaixo.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codi-

fica um polipeptídeo que possui pelo menos 70% 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 94%, 95%, 96% 97% 98%, 99%, de identidade com a SEQ ID NO: 2.

5 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 2 em não mais que 20 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 2 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

10 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 2.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO:1.

15 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 14.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 14 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

20 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 14 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 14.

25 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 13.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 24 em não mais que 2 substituições conservativas de aminoácidos.

30 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 24.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 23.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99%, de
5 identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 27.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 27 em não mais que 20 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 27 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.
10

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 27.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a
15 sequência apresentada na SEQ ID NO: 26.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 32.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 32 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.
20

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 32 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 32.
25

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 31.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de
30 identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 34.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codi-

fica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 34 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 34 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 34.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 33.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 36.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 36 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 36 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 36.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 35.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 42.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 42 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 42 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 42.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 41.

5 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 44.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 44 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 44 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

15 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 44.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 43.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 46.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 46 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

25 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 46 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 46.

30 Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 45.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codi-

fica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 48.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 48 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 48 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 48.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo com a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 47.

O método de facilitação da infecção descrito anteriormente pode compreender ainda a etapa de produção de uma cultura de vírus.

A invenção compreende ainda a cultura isolada através do método descrito anteriormente.

Qualquer um dos métodos descritos anteriormente pode compreender a etapa de produção de uma vacina para PRRS ou outra viral. A vacina pode ser morta ou viva atenuada.

A invenção compreende ainda uma célula ou uma linhagem de células em que a capacidade de uma ou mais células de ser infectada por um vírus selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae* e *Asfarviridae* foi modificada direcionando a expressão aumentada de um polipeptídeo CD163 dentro das ditas células.

Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo CD163 compreende uma região transmembrana. Em uma modalidade, o vírus é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae*. Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV. Em uma outra modalidade, o dito vírus é o vírus da arterite eqüina (EAV). Ainda em uma outra modalidade, o dito vírus é o Vírus da Febre Suína Africana (ASFV).

A célula ou a linhagem de células da invenção pode ter sido an-

teriormente não permissiva ao PRRSV e é tornada permissiva ao PRRSV através do direcionamento da expressão aumentada de um polipeptídeo CD163 dentro da dita célula ou linhagem de células.

5 A célula ou a linhagem de células da invenção inclui células ou linhagens de células que não expressavam um polipeptídeo CD163 e é induzida a expressar um polipeptídeo CD163.

As células, em uma modalidade preferida, são células animais. Podem ser células de vertebrados ou de invertebrados. As células podem ser de mamíferos. A célula ou a linhagem de células pode ser uma célula ou
10 uma linhagem de células de inseto. As células podem ser células BHK21. As células podem ser derivadas de células de rim de suínos. A célula ou a linhagem de células pode ser derivada de células de rim de felinos. As células podem ser, mas não estão limitadas às células BHK-21, NLST-1, NLFK-1, Vero ou RL. O PRRSV pode ser norte-americano ou europeu.

15 A invenção inclui um método para medir a propensão de uma célula ou linhagem de células de teste a permitir a infecção por um vírus selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae* e *Asfarviridae* que compreende:

20 a) o fornecimento de uma amostra que contém ácidos nucleicos da célula ou da linhagem de células de teste;

b) a determinação da quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 ou seu complemento na dita amostra; em que uma maior quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 em relação a uma amostra de controle derivada de uma célula
25 ou de uma linhagem de células de controle conhecida por não sustentar o crescimento do dito vírus indica uma propensão da célula ou da linhagem de células de teste a suportar a replicação do dito vírus.

Em uma modalidade, o vírus é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae*. Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV. Em
30 uma outra modalidade, o dito vírus é o vírus da arterite eqüina (EAV). Ainda em uma outra modalidade, o dito vírus é o Vírus da Febre Suína Africana (ASFV).

A quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 pode ser determinada por hibridização.

A quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 pode ser determinada por PCR.

5 A invenção inclui ainda um método para medir a propensão de uma célula ou uma linhagem de células de teste a permitir a infecção por um vírus selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae* e *Asfarviridae* que compreende:

(a) o fornecimento de uma amostra que contém polipeptídeos da
10 célula ou da linhagem de células de teste;

(b) a determinação da quantidade de polipeptídeo CD163 na dita amostra;

em que uma maior quantidade de um polipeptídeo CD163 em relação a uma amostra de controle derivada de uma célula ou de uma linhagem de células
15 de controle conhecida por não sustentar o crescimento do dito vírus indica uma propensão da célula ou da linhagem de células de teste a sustentar a replicação do dito vírus.

Em uma modalidade, o vírus é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae*. Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV. Em
20 uma outra modalidade, o dito vírus é o vírus da arterite eqüina (EAV). Ainda em uma outra modalidade, o dito vírus é o Vírus da Febre Suína Africana (ASFV).

Em uma modalidade, a determinação é realizada através do contato de um polipeptídeo CD163 com um anticorpo específico para o polipeptídeo CD163, sob condições em que o anticorpo se liga ao polipeptídeo
25 CD163.

A invenção inclui um método para medir a propensão de um porco a ser infectado por um vírus selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae* e *Asfarviridae* que compreende:

30 a) o fornecimento de uma amostra que contém ácidos nucleicos do porco que será testado;

b) a determinação da quantidade de polinucleotídeo que codifica

um polipeptídeo CD163 ou seu complemento na dita amostra;
em que uma maior quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 em relação a uma amostra de controle derivada de um porco conhecido por ser resistente à dita infecção pelo vírus indica uma propensão
5 do porco que será testado a ser infectado pelo vírus.

Em uma modalidade, o vírus é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae*. Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV. Em uma outra modalidade, o dito vírus é o vírus da arterite eqüina (EAV). Ainda em uma outra modalidade, o dito vírus é o Vírus da Febre Suína Africana
10 (ASFV).

Em uma modalidade, a determinação é realizada através da hibridização. Em uma outra modalidade, a determinação é realizada por PCR.

A invenção inclui ainda um método para medir a propensão de um porco ser infectado por um vírus selecionado do grupo que consiste em
15 *Arteriviridae* e *Asfarviridae* que compreende:

(a) o fornecimento de uma amostra que contém polipeptídeos do porco que será testado;

(b) a determinação da quantidade do polipeptídeo CD163 na dita amostra;
20 em que uma maior quantidade de um polipeptídeo CD163 em relação a uma amostra de controle derivada de um porco conhecido como sendo resistente à dita infecção pelo vírus indica uma propensão do porco que será testado a ser infectado pelo dito vírus.

Em uma modalidade, o vírus é selecionado do grupo que consiste em *Arteriviridae*. Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV. Em uma outra modalidade, o dito vírus é o vírus da arterite eqüina (EAV). Ainda em uma outra modalidade, o dito vírus é o Vírus da Febre Suína Africana (ASFV).
25

Em uma modalidade, a determinação é realizada pelo contato de um polipeptídeo CD163 com um anticorpo específico para o polipeptídeo CD163, sob condições em que o anticorpo se liga ao polipeptídeo CD163.
30

A invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado em que o poli-

peptídeo é selecionado do grupo que consiste nos polipeptídeos descritos abaixo.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, de identidade com a SEQ ID NO: 2.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 2 em não mais que 20 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 2 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo compreende a SEQ ID NO: 2.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 99%, de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 14.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 14 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 14 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo compreende a SEQ ID NO: 14.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que difere da SEQ ID NO: 24 em não mais que 2 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo compreende a SEQ ID NO: 24.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 27.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 27 em não mais que 20 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 27 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ

ID NO: 27.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 32.

5 Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 32 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 32 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

10 Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 32.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 34.

15 Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 34 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 34 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 34.

20 Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 36.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 36 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

25 Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 36 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 36.

30 A invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 38.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO:

38 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 38 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ
5 ID NO: 40.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 40.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO:
10 40 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 40 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ
ID NO: 40.

15 Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 42.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 42 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

20 Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 42 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ
ID NO: 42.

25 Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 44.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 44 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

30 Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 44 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ
ID NO: 44.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 46.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 46 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 46 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 46.

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo isolado que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 48.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 48 em não mais que 15 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polipeptídeo é um polipeptídeo que difere da SEQ ID NO: 48 em não mais que 10 substituições conservativas de aminoácidos.

Um tal polinucleotídeo compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID NO: 48.

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo CD163 isolado em que o dito polinucleotídeo é selecionado do grupo que consiste nos polinucleotídeos enumerados abaixo.

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada nas SEQ ID NOs: 1 ou 5;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 94%, 95%, 96% 97% 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 2;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 2,

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

5 (a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada nas SEQ ID NOs: 12 ou 13;

 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 14;

10 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 14,

 (d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

 Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que
15 compreende:

 (a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada nas SEQ ID NOs: 22 ou 23;

 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 24,

20 (c) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a) ou (b).

 Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

 (a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada nas SEQ ID
25 NOs: 25 ou 26;

 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 27;

 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID:
30 27,

 (d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) seqüência de polinucleotídeo apresentada nas SEQ ID NOs: 30 ou 31;

5 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 32;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 32;

10 (d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

15 (a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 33;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 34;

20 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 34;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

25 (a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 35;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 36;

30 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 36,

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de

(a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

5 (a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 37;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 38;

10 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 38;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

15 (a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 39;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 40;

20 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 40;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

25 Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 41;

30 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 42;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 42;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

5 (a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 43;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 44;

10 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 44;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

15 Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 45;

20 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 46;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 46;

25 (d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 47;

30 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO:

48;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID:

49;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de

5 (a), (b) ou (c).

Portanto, a invenção inclui ainda um polipeptídeo CD163 em que a região transmembrana está deletada.

Portanto, a invenção inclui ainda um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 em que a região transmembrana está deletada.

10 Em adição ao que foi descrito anteriormente, a invenção inclui, como um aspecto adicional, todas as modalidades da invenção que são mais específicas em escopo de qualquer maneira dos que as variações mencionadas especificamente aqui.

Breve Descrição das Listagens de Seqüências

15 SEQ ID NO: 1 - seqüência de cDNA que codifica susCD163v1 suíno

SEQ ID NO: 2 - seqüência de aminoácidos prevista do susCD163v1 suíno

20 SEQ ID NO: 3 - seqüência de cDNA, número de acesso do Genbank AJ311716

SEQ ID NO:4 - seqüência de aminoácidos prevista derivada do número de acesso do Genbank AJ311716

SEQ ID NO: 5 - seqüência de cDNA de susCD163v1 contendo uma seqüência flanqueadora (não codificadora).

25 SEQ ID NO: 6-11 - seqüências iniciadoras

SEQ ID NO: 12 - seqüência de cDNA que codifica susCD163v2 suíno contendo uma seqüência flanqueadora (não codificadora).

SEQ ID NO: 13 - seqüência de cDNA que codifica susCD163v2 suíno

30 SEQ ID NO: 14 - seqüência de aminoácidos prevista do susCD163v2 suíno

SEQ ID NO: 15-16 - seqüências iniciadoras

SEQ ID NO: 17 - seqüência de cDNA que codifica CD163v2 humano contendo uma seqüência flanqueadora (não codificadora).

SEQ ID NO: 18 - seqüência de cDNA que codifica CD163v2 humano

5 SEQ ID NO: 19 - seqüência de aminoácidos prevista do CD163v2 humano

SEQ ID NO: 20-21 - seqüências iniciadoras

SEQ ID NO: 22 - seqüência de cDNA que codifica CD163v2 murino contendo uma seqüência flanqueadora (não codificadora).

10 SEQ ID NO: 23 - seqüência de cDNA que codifica CD163v2 murino

SEQ ID NO: 24 - seqüência de aminoácidos prevista do CD163v2 murino

15 SEQ ID NO: 25 - seqüência de cDNA que codifica CD163v3 murino contendo uma seqüência flanqueadora (não codificadora).

SEQ ID NO: 26 - seqüência de cDNA que codifica CD163v3 murino

SEQ ID NO: 27 - seqüência de aminoácidos prevista do CD163v3 murino

20 SEQ ID NO: 28-29 - seqüências iniciadoras

SEQ ID NO: 30 - seqüência de cDNA que codifica MARC-145 CD163v3 contendo uma seqüência flanqueadora (não codificadora).

SEQ ID NO: 31 - seqüência de cDNA que codifica MARC-145 CD163v3

25 SEQ ID NO: 32 - seqüência de aminoácidos prevista de MARC-145 CD163v3

SEQ ID NO: 33 - seqüência de cDNA que codifica o produto da transcrição de CD163v2 de células Vero

30 SEQ ID NO: 34 - seqüência de aminoácidos prevista de CD163v2 de células Vero

SEQ ID NO: 35 - seqüência de cDNA que codifica o produto da transcrição CD163v3 de células Vero

SEQ ID NO: 36 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v3 de células Vero

SEQ ID NO: 37 - sequência de cDNA que codifica o produto da transcrição CD163v4 de células Vero

5 SEQ ID NO: 38 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v4 de células Vero

SEQ ID NO: 39 - sequência de cDNA que codifica o produto da transcrição CD163v5 de células Vero

10 SEQ ID NO: 40 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v5 de células Vero

SEQ ID NO: 41 - sequência de cDNA que codifica o produto da transcrição CD163v6 de células Vero

SEQ ID NO: 42 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v6 de células Vero

15 SEQ ID NO: 43 - sequência de cDNA que codifica o produto da transcrição CD163v7 de células Vero

SEQ ID NO: 44 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v7 de células Vero

20 SEQ ID NO: 45 - sequência de cDNA que codifica o produto da transcrição de CD163v2 canino.

SEQ ID NO: 46 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v2 canino

SEQ ID NO: 47 - sequência de cDNA que codifica o produto de transcrição de CD163v3 canino.

25 SEQ ID NO: 48 - sequência de aminoácidos prevista de CD163v3 canino

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 - Comparação esquemática de susCD163v1 com AJ311716

30 Figura 2 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de susCD163v1 (SEQ ID NO: 2) com AJ311716 (SEQ ID NO: 4)

Figura 3 - Alinhamento da sequência de nucleotídeos de

susCD163v1 com AJ311716

Figura 4 - Produção de fragmentos de DNA e ligação para colocar CD163 diretamente atrás do promotor RSV. Os plasmídeos foram digeridos com *DraIII* ou *DrdI*, seguido por uma reação de formação de pontas cegas com a enzima de Klenow. Após a limpeza, os plasmídeos foram digeridos com *NotI*. A purificação em gel forneceu fragmentos de DNA que foram subsequentemente ligados utilizando os terminais *NotI* coesivos. Os promotores de RSV (pRSV) e SV40 (pSV40) são indicados com setas.

Figura 5 - Mapa do vetor de clonagem pCDNA3.1 Direcional V5/His/TOPO

Figura 6 - Três linhagens de células BHK/CMV/v1, Nº 3, Nº 5 e Nº 12 e uma linhagem de células BHK não permissiva foram infectadas com o isolado P129 de PRRSV e coradas com SDOW17-FITC. O Painel A mostra um clone de células BHK21 não permissivas. O Painel B mostra o clone Nº 3 de BHK/CMV/v1. O Painel C mostra o clone Nº 5 de BHK/CMV/v1. O Painel D mostra o clone Nº 12 de BHK/CMV/v1.

Figura 7 - Três Linhagens de células BHK/RSV/v1, Nº 2, Nº 3 e Nº 4 foram infectadas com o isolado P129 de PRRSV e coradas com SDOW17-FITC. O Painel A mostra o clone Nº 2 de BHK/RSV/v1. O Painel B mostra o clone Nº 3 de BHK/RSV/v1. O Painel C mostra o clone Nº 4 de BHK/RSV/v1.

Figura 8 - Linhagens de células de rim de felinos expressando de forma estável CD163v1 suíno, exibindo placas de PRRSV. Linhagens de células NLFK-CMV-susCD163v1-G4F e NLFK-CMV-susCD163v1-G4L, ambas na passagem 4, foram infectadas com o isolado P129 do PRRSV norte-americano e incubadas durante 6 dias. As monocamadas foram fixadas com 80% de acetona e coradas com o anticorpo monoclonal SDOW17-FITC. A microscopia de contraste de fase (à direita) mostra regiões localizadas de CPE viral CPE (placas), enquanto a detecção por FA (à esquerda) mostra o antígeno de nucleocapsídeo co-localizado.

Figura 9 - Quatro linhagens de células FK/RSV/v1, Nº 1, Nº 2, Nº 3 e Nº 4 foram infectadas com o isolado P129 de PRRSV e coradas com

o anticorpo monoclonal SDOW17-FITC. O Painel A mostra o clone Nº 1 de células FK/RSV/v1. O Painel B mostra o clone Nº 2 de FK/RSV/v1. O Painel C mostra o clone Nº 3 de FK/RSV/v1. O Painel D mostra FK/RSV/v1 Nº 4.

Figura 10 - Células PK-CMV-susCD163v1-A10 na passagem 19, infectadas com o isolado P129 de PRRSV. À esquerda: A monocamada foi fixada com 80% de acetona e corada com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc), que é específico para o nucleocapsídeo de PRRSV. À direita: A mesma cavidade sob iluminação de campo brilhoso, mostrando a distribuição das células.

Figura 11 - BHK-CMVScript-susCD163v2-A9 na passagem 17 infectadas com o isolado P129 de PRRSV. A monocamada foi fixada com 80% de acetona e corada com anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc), que é específico para o nucleocapsídeo de PRRSV.

Figura 12 - Três exemplos representativos das linhagens de células BHK/RSV/v2. As células foram infectadas com o isolado P129 de PRRSV e subsequentemente coradas com SDOW17-FITC. O Painel A mostra a linhagem de células BHK/RSV/v2 Nº 1, o painel B mostra a linhagem de células BHK/RSV/v2 Nº 34 e o painel C mostra a linhagem de células BHK/RSV/v2 Nº 47.

Figura 13 - FK-cDNA3.1D-humCD163v2-A6 na passagem 15 infectadas com o isolado P129 de PRRSV. A monocamada foi então fixada com 80% de acetona e corada com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc), que é específico para o nucleocapsídeo de PRRSV.

Figura 14 - A quantidade de progênie de PRRSV produzida por quatro linhagens de células recombinantes que expressam de forma estável susCD163v1 e por células MARC-145, foi determinada em um experimento de curva de crescimento utilizando o isolado NVSL 94-3 de PRRSV. As amostras coletadas em intervalos de 12 horas foram tituladas em monocamadas de células MARC-145.

Figura 15 - Análise de citometria de fluxo da infecção por PR-

RSV na presença do anticorpo específico a CD163. As células BHK-21 expressando MARC-145 CD163 partindo da transfecção transitória foram incubadas com o anticorpo específico a CD163 ou a IgG de cabra normal (NGS) e infectadas com um PRRSV que expressa GFP. Cada ponto de dados representa os resultados de cavidades em triplicata.

Figura 16 - Análise de citometria de fluxo da infecção por PRRSV na presença do anticorpo específico a CD163. As células NLFK expressando de forma estável CD163 humano foram incubadas com o anticorpo específico a CD163 ou a IgG de cabra normal (NGS) e infectadas com um PRRSV expressando GFP. 24 horas após a infecção foi determinada a porcentagem de células infectadas expressando GFP. Cada ponto de dados representa o resultado de uma única cavidade de células

Figura 17 - Representação gráfica de seis variações alternativas de processamento do mRNA da CD163 recuperadas de células Vero. As seis variações diferem na presença ou na ausência de três éxons, denominados E6, E105 e E83. Os éxons E6 e E105 possuem comprimentos que são múltiplos de três e, portanto, não resultam em uma alteração no quadro de leitura quando ausentes. Em contraste, a ausência de E83 resulta em um quadro de leitura alterado e em uma sequência de aminoácidos alternativa no terminal carboxi da proteína (indicado por um padrão hachuriado na figura). A região hidrofóbica transmembrana (TM) é codificada dentro de E105.

Figura 18 - Células PK-RSVScript-susCD163v2 Nº 9 infectadas com o isolado P129 de PRRSV. O sobrenadante não diluído de PAMs infectadas com o isolado P210 de PRRSV foi utilizado para infectar as células PK-RSVScript-susCD163v2 Nº 9. Após dois dias de incubação as células foram fixadas e coradas com o anticorpo monoclonal SDOW17 como descrito no Exemplo 11.

Figura 19 - Células FK-RSVScript-susCD163v2 Nº 51 infectadas com o isolado P129 de PRRSV. O sobrenadante não diluído de PAMs infectadas com o isolado P201 de PRRSV foi utilizado para infectar as células FK-RSVScript-susCD163v2 Nº 51. Dois dias após a infecção, as células foram fixadas com acetona e coradas com o anticorpo monoclonal SDOW17

como descrito no Exemplo 11.

Figura 20 - Infecção das células do clone Nº 9 de PK-RSVScript-susCD163v2 com o isolado P201 de PRRSV. O Painel A mostra uma monocamada de células infectada com P201 de PRRSV na passagem 1, vinte e quatro horas após a infecção. O Painel B mostra uma monocamada de células 2 dias após a infecção com o sobrenadante de P201 de PRRSV isento de células na passagem 10.

Figura 21 - Células parentais NLFK e um subclone de FK-cDNA3.1D-humCD163v2-A6 foram verificados em relação à expressão de CD163. As células foram fixadas em 80% de acetona e reagidas com anti-CD163 humano de Cabra (R&D System a 1:200) durante uma hora seguido pela lavagem com PBS. Para a visualização, foi utilizada a IgG anticabra de macaco conjugada com FITC (Biodesign Inc a 1:100). Não foi detectada fluorescência específica nas células parentais NLFK como mostrado na Figura 21A. A maior parte do subclone FK.A6.A2 exibiu boa coloração fluorescente indicando a presença de CD163 (Figura 21B).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições Gerais

As células e as linhagens de células podem ser "permissivas ao vírus" ou "não permissivas ao vírus". Por exemplo, a célula ou a linhagem de células que é permissiva ao vírus é capaz de permitir a infecção pelo vírus, subsequente à replicação e à produção de vírus. Uma célula ou uma linhagem de células que é não permissiva ao vírus é incapaz de permitir a infecção pelo vírus, subsequente à replicação e à produção do vírus. Uma linhagem de células, que já é de alguma maneira permissiva, pode ser transformada em mais permissiva através dos métodos da invenção.

Arteriviridae se refere a uma família de vírus de RNA de filamento positivo envelopado que pertence à ordem *Nidovirales*. A família inclui o vírus de aumento da lactato desidrogenase (LDV) de camundongos, o vírus da arterite eqüina (EAV), o vírus da febre hemorrágica de símios (SHFV) e o PRRSV.

Asfarviridae é uma família de vírus envelopados icosaédricos

cujos genomas consistem em moléculas isoladas de DNA de filamento duplo linear com aproximadamente 150000–190000 nucleotídeos de comprimento. O nome da família é derivado dos Vírus da Febre Suína Africana e Relacionados (African Swine Fever e Related Viruses). O Vírus da Febre Suína Africana (ASFV) é o tipo de espécie do gênero *Asfivirus* e é o único membro da família.

O termo "PRRSV" ou vírus PRRS se refere tanto aos genótipos do vírus PRRS Europeus quanto Norte-americanos. Dentro de cada genótipo, os isolados compartilham tipicamente 85% ou uma identidade maior de nucleotídeos. Entre os genótipos, entretanto, o nível de identidade de sequência é de apenas aproximadamente 60%.

O vírus PRRS é um membro da família *Arteriviridae*. O genoma dos arterivírus é de RNA de filamento simples de polaridade positiva entre 12 e 16 kb de comprimento, capeado na extremidade a 5' e poliadenilado na extremidade a 3'. Mais de dois terços do genoma é dedicado aos quadros abertos de leitura ("Open Reading Frames" - ORFs) 1a e 1b, que codificam as funções não estruturais do vírus. O ORF1b é uma extensão do ORF1a e é o resultado de uma alteração de quadro ribossomal ("Ribossomal frame-shift"). Os ORFs 1a e 1b são traduzidos diretamente partindo do RNA genômico. Estes produtos polipeptídicos grandes são clivados por proteases virais para fornecer 12 ou 13 peptídeos menores distintos. Os ORFs restantes, que codificam as proteínas estruturais virais, são expressos partindo de uma série de RNA subgenômicos co-terminais a 3' (sgRNAs). Os sgRNAs são produzidos através da transcrição descontínua de RNA de filamento negativo, de forma que a sequência líder a 5' comum fica fundida com cada produto da transcrição. As proteínas estruturais principais são o nucleocapsídeo (N, codificado pelo ORF7), a proteína de matriz (M, codificada pelo ORF6) e a glicoproteína de envelope principal (GP5, codificada pelo ORF5). As proteínas restantes, GP4 (ORF4), GP3 (ORF3), GP2 (ORF2a) e E (ORF2b) são componentes estruturais de menor importância do vírion, cujas funções ainda não foram elucidadas. A biologia molecular do PRRSV tem sido o assunto de artigos de revisão recentes (Dea e outros, 2000; Meulenbergh, 2000;

Snijder e Meulenberg, 2001).

Como utilizado aqui, o termo "polipeptídeo CD163" significa uma proteína codificada por um gene CD163 de mamífero, incluindo as variações alélicas que contêm alterações conservativas ou não conservativas. Uma
5 sequência de cDNA que codifica um polipeptídeo suíno CD163 foi relatada (número de acesso do Genbank AJ311716). Um polipeptídeo CD163 murino também foi relatado (número de acesso do Genbank AF274883), assim como inúmeras variações humanas, exemplificadas pelos números de acesso do Genbank AAH51281 e CAA80543. Foram relatados aqui polinucleotídeos
10 que codificam polipeptídeos CD163 suínos, humanos, murinos, caninos e de macaco verde africano e que compreendem as seqüências apresentadas na SEQ ID NO: 1, 5, 12 13, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 30, 31 33, 35, 37, 39, 41, 42, 43, 45 e 47. Um "polipeptídeo CD163" é um membro da família rica em cisteína do receptor em cadafalso (SRCR) das glicoproteínas transmembrana e
15 acredita-se que seja expresso exclusivamente nos monócitos e nos macrófagos. Uma função identificada do CD163 é inibir os danos oxidativos de tecidos após a hemólise através do consumo de complexos de hemoglobina:haptoglobina por endocitose. A liberação subsequente da interleucina-10 e a síntese da heme oxigenase-1 resultam em efeitos antiinflamatórios e citoprotetores (Philippidis e outros, 2004; Graversen e outros, 2002). O gene
20 CD163 humano abrange 35 kb no cromossomo 12 e consiste em 17 éxons e 16 íntrons. Sabe-se que um número de isoformas do polipeptídeo CD163, incluindo os tipos ligados à membrana, citoplasmáticos e secretados, é gerado através do processamento alternativo (Ritter e outros, 1999). As isoformas
25 que compreendem um domínio transmembrana são particularmente preferidas.

Um domínio transmembrana é caracterizado por um segmento polipeptídico de uma seqüência maior que fica exposto em ambos os lados de uma membrana. Os domínios citoplasmático e extracelular são separados por pelo menos um segmento que abrange membrana que atravessa o
30 ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica. O segmento que abrange membrana é composto de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais não po-

lares, geralmente na forma de uma alfa hélice. Os segmentos que contêm aproximadamente 20-30 resíduos hidrofóbicos são grandes o suficiente para abranger uma membrana na forma de uma alfa hélice e podem ser frequentemente identificados através de um gráfico de hidropatia. O domínio transmembrana previsto das SEQ ID NOS:2 e 14 é indicado em negrito no relatório descritivo. A determinação do fato de que outras seqüências CD163 contêm uma característica de seqüência similar é facilmente realizada através da inspeção da seqüência ou dos gráficos de hidropatia. As SEQ ID NOS: 37-40 são representativas de proteínas CD163 variantes que não contêm um domínio transmembrana e das que codificam ácidos nucléicos.

Como utilizado posteriormente aqui, "polinucleotídeo" se refere de forma geral a qualquer polirribonucleotídeo ou polidesoxirribonucleotídeo, que pode ser RNA ou DNA não modificado ou RNA ou DNA modificado. "Polinucleotídeos" incluem, sem limitação, DNA de filamento simples e duplo, DNA que é uma mistura de regiões de filamento simples e duplo, RNA de filamento simples e duplo, RNA que é uma mistura de regiões de filamento simples e duplo e moléculas híbridas que compreendem DNA e RNA que podem ter filamento simples ou, mas tipicamente, filamento duplo ou uma mistura de regiões de filamento simples ou duplo. Em adição, "polinucleotídeo" se refere a regiões de filamento triplo que compreendem RNA ou DNA ou tanto RNA quanto DNA. O termo "polinucleotídeo" inclui ainda DNAs ou RNAs que contêm uma ou mais bases modificadas e DNAs ou RNAs com estruturas modificadas em relação à estabilidade ou por outras razões. As bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases incomuns tal como inosina. Uma variedade de modificações pode ser feita no DNA e no RNA; assim, "polinucleotídeo" abrange formas modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente de polinucleotídeos que são tipicamente encontrados na natureza, assim como as formas químicas de DNA e de RNA características de vírus e de células. "Polinucleotídeo" abrange ainda polinucleotídeos relativamente curtos, freqüentemente referidos como oligonucleotídeos.

Como utilizado posteriormente aqui, "polipeptídeo" se refere a

qualquer peptídeo ou proteína que compreende aminoácidos ligados um aos outros por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas. "Polipeptídeo" se refere tanto a cadeias curtas, comumente referidas como peptídeos, oligopeptídeos ou oligômeros quanto a cadeias mais longas, geralmente referidas como proteínas. Os polipeptídeos podem conter aminoácidos sem ser os 20 aminoácidos codificados pelos genes. "Polipeptídeos" incluem seqüências de aminoácidos modificadas por processos naturais, tal como o processamento pós-tradução ou através de técnicas de modificação química que são bem-conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, assim como em uma literatura de pesquisa volumosa. As modificações podem ocorrer em qualquer local de um polipeptídeo, incluindo a estrutura do peptídeo, as cadeias laterais dos aminoácidos e os terminais amino ou carboxila. Será considerado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo ou em graus variáveis em vários locais em um certo polipeptídeo. Ainda, um certo polipeptídeo pode conter muitos tipos de modificações. Os polipeptídeos podem ser ramificados como um resultado da ubiquitinação e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Os polipeptídeos cíclicos, ramificados e cíclicos ramificados podem resultar dos processos naturais pós-tradução ou podem ser feitos através de métodos sintéticos. As modificações ou as formas modificadas incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de um grupamento heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou de um derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídeo ou derivado de lipídeo, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ponte dissulfeto, desmetilação, formação de ligações cruzadas covalentes, formação de cistina, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de ancoragem de GPI, hidroxilação, iodinação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação prenilação, racemização, selenoilação, sulfação, adição de aminoácidos nas proteínas mediada pela transferência de RNA tal como a arginilação e a ubiquitinação (ver, por exemplo, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2^a Ed., T. E. Crei-

ghton, W. H. Freeman e Company, Nova York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 em Postranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova York, 1983; Seifter e outros, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol (1990) 182: 626-646 e Rattan e outros, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 4842).

Como utilizado posteriormente aqui, "isolado" significa alterado pela mão humana partindo do estado natural. Se uma composição ou uma substância "isolada" ocorrer na natureza, esta foi alterada ou removida de seu ambiente original ou ambos. Por exemplo, um polinucleotídeo ou um polipeptídeo naturalmente presente em um animal vivo não é "isolado", mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo separado dos materiais co-existent de seu estado natural é "isolado", como o termo é empregado aqui. Portanto, "isolado" como utilizado aqui e como entendido na técnica, seja se referindo aos polinucleotídeos ou aos polipeptídeos "isolados", é considerado como significando separado do ambiente celular original em que o polipeptídeo ou o ácido nucléico é normalmente encontrado. Como utilizado aqui, portanto, apenas com a finalidade de exemplo, um animal transgênico ou uma linhagem de células recombinante construída com um polinucleotídeo da invenção faz uso do ácido nucléico "isolado". São especificamente excluídos da definição de polinucleotídeos isolados da invenção os cromossomos isolados inteiros das células hospedeiras nativas dos quais o polinucleotídeo foi originalmente derivado.

Na descrição a seguir será freqüentemente feito uso do termo "identidade" ou similaridade que é aplicado às seqüências de aminoácidos de polipeptídeos. A porcentagem de "identidade" de seqüência de aminoácidos em relação aos polipeptídeos é definida aqui como uma porcentagem de resíduos de aminoácidos na seqüência candidata que são idênticos aos resíduos nas seqüências de alvo após o alinhamento de ambas as seqüências e a introdução de espaços, se necessário, para atingir a identidade de seqüência percentual máxima e não considerando quaisquer substituições

conservativas como parte da identidade de seqüência. A porcentagem de identidade de seqüência é determinada através de métodos convencionais. Por exemplo, BLASTP 2.2.6 [Tatusova TA e TL Madden, "BLAST 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences".

5 (1999) FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250.]

Sucintamente, como observado anteriormente, duas seqüências de aminoácidos são alinhadas para otimizar os escores de alinhamento utilizando uma penalidade de abertura de espaços de 10, uma penalidade de extensão de espaços de 0,1 e a matriz de atribuição de escore "blosum62" de Henikoff e Henikoff (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919. 1992).

10

A porcentagem de identidade é então calculada como:

$$\frac{\text{Número total de combinações idênticas}}{\text{comprimento da seqüência mais longa} + \text{número de espaços introduzidos na seqüência mais longa para alinhar as duas seqüências}} \times 100$$

A porcentagem de "similaridade" de seqüência (freqüentemente referida como "homologia") em relação a um polipeptídeo da invenção é definida aqui como uma porcentagem de resíduos de aminoácidos na seqüência candidata que são idênticos aos resíduos nas seqüências de alvo após o alinhamento das seqüências e da introdução de espaços, se necessário, para atingir a identidade de seqüência percentual máxima (como descrito anteriormente) e considerando ainda quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de seqüência.

20

$$\frac{\text{Número total de combinações idênticas e substituições conservativas}}{\text{comprimento da seqüência mais longa} + \text{número de espaços introduzidos na seqüência mais longa para alinhar as duas seqüências}} \times 100$$

Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com as propriedades físicas e com a contribuição para as estruturas secundária e terciária da proteína. Uma substituição conservativa é reconhecida na técnica como uma substituição de um aminoácido por um outro aminoácido que possui propriedades similares.

25

Os exemplos de substituições conservativas são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 abaixo.

Tabela 1Substituições conservativas ICADEIA LATERALCARACTERÍSTICAAMINOÁCIDO

5	Alifático	
	Não polar	G A P I L V
	Polar – não carregado	C S T M N Q
10	Polar - carregado	D E K R
	Aromático	H F W Y
	Outro	N Q D E

- Alternativamente, os aminoácidos conservativos podem ser agrupados como descrito em Lehninger, [Biochemistry, Segunda Edição; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp.71-77] como apresentado na Tabela 2, imediatamente abaixo

Tabela 2Substituições conservativas II20 CADEIA LATERALCARACTERÍSTICAAMINOÁCIDO

	Não polar (hidrofóbico)	
	A. Alifático:	A L I V P
	B. Aromático:	F W
25	C. Que contém enxofre:	M
	D. Limite:	G
	Polar não carregado	
	A. Hidroxila:	S T Y
	B. Amidas:	N Q
30	C. Sulfidrila:	C
	D. Limite:	G
	Carregado Positivamente (Básico):	K R H

Carregado Negativamente (Ácido): DE

Ainda como uma outra alternativa, os exemplos de substituições conservativas são apresentados na Tabela 3, imediatamente abaixo.

Tabela 3

5 Substituições conservativas III

<u>Resíduo Original</u>	<u>Exemplo de Substituição</u>
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
10 Asp (D)	Glu

Substituições conservativas III

<u>Resíduo Original</u>	<u>Exemplo de Substituição</u>
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
15 Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
20 Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
25 Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

Métodos Direcionados para a Produção de Vírus e de Células Hospedeiras da Invenção

- 30 A invenção fornece um método de produção modificada de um vírus que é um membro das famílias *Arteriviridae* e *Asfarviridae* em uma célula que compreende a etapa de direcionamento da dita célula a expressar

um polipeptídeo CD163. Pode incluir transformar uma célula não permissiva ao vírus em uma célula permissiva ao vírus ou pode envolver a produção de uma célula mais permissiva ao vírus.

5 Em uma modalidade, o vírus que é um membro da família *Arteriviridae* ou *Asfarviridae* é selecionado do grupo que consiste no LDV de camundongos, do vírus da arterite eqüina (EAV), do vírus da febre hemorrágica de símios (SHFV), do PRRSV de suíno e do ASFV de suíno.

Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV.

10 A invenção fornece ainda um método de preparação de uma cultura de um vírus que é um membro da família *Arteriviridae* ou *Asfarviridae* que compreende as etapas de: fornecimento de uma linhagem de células; direcionamento da dita linhagem de células a expressar um polipeptídeo CD163; infecção da dita linhagem de células com o vírus; e fazer com que a dita linhagem de células produza a progênie viral.

15 Em uma modalidade, o vírus que é um membro da família *Arteriviridae* é selecionado do grupo que consiste no LDV de camundongos, do vírus da arterite eqüina (EAV), do vírus da febre hemorrágica de símios (SHFV), do PRRSV de suíno e do ASFV de suíno.

Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV.

20 Todos os métodos anteriores utilizam células e linhagens de células que expressam um polipeptídeo CD163. O CD163 pode ser facilitado ou aumentado através de métodos que envolvem a introdução de ácido nucléico exógeno na célula. Toda célula pode compreender um polinucleotídeo ou um vetor de uma maneira que permita a expressão de um polipeptídeo
25 CD163 codificado.

Os polinucleotídeos que codificam CD163 podem ser introduzidos na célula hospedeira como parte de um plasmídeo circular ou na forma de um DNA linear que compreende uma região codificadora de proteína isolada ou em um vetor viral. Os métodos para a introdução de ácido nucléico
30 exógeno na célula hospedeira bem-conhecidos e praticados de forma rotineira na técnica incluem a transformação, a transfecção, a eletroporação, a injeção nuclear ou a fusão com veículos tais como lipossomos, micelas, célu-

las fantasmas e protoplastos. Os sistemas de células hospedeiras da invenção incluem sistemas de células de invertebrados e de vertebrados. Os hospedeiros podem incluir, mas não estão limitados aos seguintes: células de insetos, células de rim suínas (PK), células de rim de felinos (FK), células testiculares suínas (ST), células de rim do macaco verde africano (células MA-104, MARC-145, VERO e COS), células de ovário de hamster chinês (CHO), células de rim de hamsters bebês, células 293 humanas e fibroblastos 3T3 murinos. Os sistemas de cultura de células hospedeiras de insetos podem também ser utilizados para a expressão de polipeptídeos CD163. Em uma outra modalidade, os polipeptídeos CD163 são expressos utilizando um sistema de expressão em drosófila.

A escolha de um vetor de expressão adequado para a expressão dos polipeptídeos CD163 dependerá evidentemente da célula hospedeira específica que será utilizada e está dentro do conhecimento do versado na técnica. Os exemplos de vetores de expressão adequados incluem pS-port e pcDNA3 (Invitrogen), pCMV-Script (Stratagene) e pSVL (Pharmacia Biotech). Os vetores de expressão para uso em células hospedeiras de mamíferos podem incluir seqüências de controle da transcrição e da tradução derivadas de genomas virais. As seqüências promotoras e as seqüências modificadoras comumente utilizadas que podem ser utilizadas na presente invenção incluem, mas não estão limitadas às derivadas do citomegalovírus humano (CMV), do vírus de sarcoma de Rous (RSV), do Adenovírus 2, do vírus Polioma e do vírus de Símio 40 (SV40). Os métodos para a construção de vetores de expressão em mamíferos são descritos, por exemplo, em Okayama e Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3: 280 (1983)); Cosman e outros (*Mol. Immunol.* 23: 935 (1986)); Cosman e outros (*Nature* 312: 768 (1984)); EP-A-0367566; e WO 91/18982.

Devido ao fato de que se sabe que as seqüências CD163 existem em células de várias espécies, o gene endógeno pode ser modificado para permitir ou aumentar, a expressão do polipeptídeo CD163. As células podem então ser modificadas (por exemplo, através da recombinação homóloga) para fornecer maior expressão através da substituição, em um todo ou

em parte, do promotor CD163 que ocorre naturalmente por todo ou uma parte de um promotor heterólogo, de forma que as células expressem o polipeptídeo CD163 em níveis maiores. O promotor heterólogo é inserido de maneira tal que fica ligado de forma operacional às seqüências que codificam o CD163 endógeno. [Ver, por exemplo, a Publicação Internacional PCT Nº WO 94/12650, a Publicação Internacional PCT Nº WO 92/20808 e a Publicação Internacional PCT Nº WO 91/09955.] É também considerado que, em adição ao DNA do promotor heterólogo, um DNA marcador que pode ser amplificado (por exemplo, *ada*, *dhfr* e o gene *cad* multifuncional, que codificam a carbamil fosfato sintase, a aspartato transcarbamilase e dihidroorotase) e/ou o DNA intrônico podem ser inseridos junto com o DNA do promotor heterólogo. Se ligada à seqüência codificadora de CD163, a amplificação do DNA marcador através de métodos de seleção padronizados resulta na co-amplificação das seqüências codificadoras de CD163 nas células.

15 A expressão de CD163 também pode ser induzida através de tratamento químico. Os ésteres de forbol, especialmente o miristil acetato de forbol (PMA), ativam uma ou mais isoenzimas do receptor de membrana ubíqua, a proteína quinase C (PKC) e são meios particularmente preferidos para aumentar a expressão de CD163. Outros métodos de mobilização intracelular de cálcio também são considerados.

Produção de Vacina

Os métodos descritos anteriormente podem ser utilizados para produzir qualquer vírus que seja um membro da família *Arteriviridae* ou *Asfarviridae* com a finalidade de produção de vacina ou de diagnóstico.

25 Em uma modalidade, o vírus que é um membro da família *Arteriviridae* é selecionado do grupo que consiste no LDV de camundongos, do vírus da arterite eqüina (EAV), do vírus da febre hemorrágica de símios (SHFV) e do PRRSV de suíno.

Em uma modalidade preferida, o vírus é o PRRSV.

30 Produção de Vacina

Os métodos descritos anteriormente podem ser utilizados para produzir vírus com a finalidade de produção de vacina ou de diagnóstico.

Podem ser produzidas vacinas mortas (mortas) ou vivas. Portanto, para produzir uma vacina viva, um isolado viral ou uma variação atenuada ou mutada do mesmo, é crescido em cultura de células. O vírus é coletado de acordo com métodos bem-conhecidos na técnica. O vírus pode então
5 ser concentrado, congelado e armazenado a -70°C ou seco por congelamento e armazenado a 4°C . Antes da vacinação o vírus é misturado em uma dosagem apropriada, (que é de aproximadamente 10^3 até 10^8 doses infecciosas de cultura de tecido por mL ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)), com um veículo farmacologicamente aceitável tal como uma solução salina e opcionalmente um
10 adjuvante.

A vacina produzida poderia ainda compreender uma vacina morta ou morta que compreende um vírus crescido através dos métodos da invenção. A vacina morta é feita através de métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, uma vez que o vírus é propagado até títulos altos, seria
15 rapidamente evidente para os versados na técnica que a massa antigênica do vírus poderia ser obtida através de métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, a massa antigênica do vírus pode ser obtida através da diluição, da concentração ou da extração. Todos estes métodos foram empregados para a obtenção da massa antigênica do vírus apropriada para produzir
20 vacinas. O vírus é então morto através do tratamento com formalina, betapropiolactona (BPL), etilenoimina binária (BEI) ou outros métodos conhecidos pelos peritos na técnica. O vírus morto é então misturado com um veículo farmacologicamente aceitável tal como uma solução salina e opcionalmente um adjuvante. Os exemplos de adjuvantes incluem, mas não estão limitados
25 ao hidróxido de alumínio, às emulsões de óleo-em-água e de água-em-óleo, AMPHIGEN, saponinas tal como QuilA e adjuvantes de polipeptídeos incluindo interleucinas, interferons e outras citocinas.

A inativação pela formalina é realizada através da mistura da suspensão viral com 37% formaldeído a uma concentração final de 0,05%. A
30 mistura de vírus-formaldeído é feita através da agitação constante durante aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente. A mistura de vírus morto é então testada em relação ao vírus vivo residual através da análise do

crescimento em uma linhagem de células adequada.

A inativação por BEI é realizada através da mistura da suspensão viral da presente invenção com BEI a 0,1 M (2-bromo-etilamina em NaOH a 0,175 N) até uma concentração final de BEI a 1 mM. A mistura de vírus-BEI é feita através da agitação constante durante aproximadamente 48 horas à temperatura ambiente, seguida pela adição de tiosulfato de sódio a 1,0 M até uma concentração final de 0,1 mM. A mistura é mantida durante mais duas horas. A mistura de vírus morto é testada em relação ao vírus vivo residual através da análise do crescimento em uma linhagem de células adequada.

As células permissivas ao vírus que foram direcionadas a expressarem CD163 podem também ser utilizadas para quantificar o vírus vivo. Dois métodos comuns, que são bem-conhecidos pelos versados na técnica, são o ensaio de placas e o ensaio de diluição limitante.

As linhagens de células que expressam CD163 da presente invenção podem ser utilizadas para crescer vírus com a finalidade de produzir antígeno viral para kits para diagnóstico. Por exemplo, os lisados de células infectadas (com purificação opcional de partículas virais ou extração de proteínas virais selecionadas) podem ser revestidos em placas de ELISA a fim de detectar e quantificar anticorpos para o vírus no soro suíno.

O vírus vivo ou morto crescido nas células que expressam CD163 pode ser utilizado após a separação opcional das proteínas virais para imunizar animais a fim de gerar anticorpos policlonais, monoespecíficos ou monoclonais. Estes, por sua vez, podem ser utilizados como a base de ensaios para diagnóstico para a detecção e para a quantificação do vírus no soro suíno e em outras amostras biológicas.

Ensaio da Invenção

A invenção fornece métodos para a determinação da propensão de um animal ser infectado por um vírus que é um membro da família *Arteriviridae* ou *Asfarviridae* ou de uma linhagem de células para sustentar a replicação de um vírus que é um membro da família *Arteriviridae* ou *Asfarviridae*. As amostras de qualquer uma das fontes são obtidas e analisadas em rela-

ção à expressão de CD163. O nível de expressão do gene CD163 pode ser comparado com os níveis dos controles conhecidos por não sustentarem a replicação do vírus.

No caso de um animal, as amostras podem ser qualquer amostra que compreende ácidos nucleicos ou proteínas da amostra e obtida de qualquer tecido corporal que expressa CD163, incluindo, mas não limitado aos macrófagos alveolares, às células cultivadas, às biópsias ou a outras preparações de tecido. O nível de expressão pode ser avaliado em qualquer ou em ambos os níveis de RNA mensageiro ou de proteína produzidos. Em uma modalidade preferida, o membro do vírus da família *Arteriviridae* ou *Asfarviridae* é selecionado do grupo que consiste no LDV de camundongos, do vírus da arterite eqüina (EAV), no vírus da febre hemorrágica de símios (SHFV), no PRRSV de suíno e no ASFV de suíno.

Ensaio Baseados em Ácidos Nucleicos

Os métodos de determinação de níveis de CD163 podem ser baseados em ácidos nucleicos como observado anteriormente. Os ácidos nucleicos derivados de CD163 podem estar em solução ou em um suporte sólido. Em algumas modalidades, podem ser empregados na forma de elementos de arranjos em microarranjos isoladamente ou em combinação com outras moléculas dos elementos do arranjo. Os métodos baseados em ácidos nucleicos requerem geralmente o isolamento do DNA ou do RNA da amostra e a subsequente hibridização ou amplificação pela PCR utilizando iniciadores específicos de qualquer CD163 conhecido que codifica as seqüências na técnica ou aquelas descritas especificamente como as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12, 13, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 30, 31 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47. O DNA ou o RNA pode ser isolado da amostra de acordo com qualquer um de um número de métodos bem-conhecidos pelos peritos na técnica. Por exemplo, os métodos de purificação de ácidos nucleicos são descritos em Tijssen, P. (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, Nova York, N.Y. Em uma modalidade preferida, o RNA total é isolado utilizando o reagente de isolamento de RNA total TRI-

ZOL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg Md.) e o mRNA é isolado utilizando cromatografia em coluna de óligo d(T) ou esferas de vidro. Quando as moléculas de ácidos nucleicos da amostra são amplificadas é desejável amplificar as moléculas de ácidos nucleicos da amostra e manter as abundâncias relativas da amostra original, incluindo os produtos da transcrição de baixa abundância. O RNA pode ser amplificado *in vitro*, *in situ* ou *in vivo* (Ver Eberwine Patente U.S. Nº 5.514.545).

É ainda vantajoso incluir os controles dentro da amostra para garantir que a amplificação e os procedimentos de marcação não alteram a distribuição real das moléculas de ácidos nucleicos em uma amostra. Para esta finalidade, uma amostra é salpicada com uma quantidade de uma molécula de ácido nucleico de controle predeterminada para poder ser detectada após a hibridização com sua molécula de ácido nucleico complementar no arranjo e a composição de moléculas de ácidos nucleicos inclui moléculas de ácidos nucleicos de referência que se hibridizam especificamente com as moléculas de ácidos nucleicos de controle no arranjo. Após a hibridização e o processamento, os sinais de hibridização obtidos devem refletir acuradamente as quantidades de moléculas de ácidos nucleicos de controle no arranjo adicionadas à amostra.

Antes da hibridização, pode ser desejável fragmentar as moléculas de ácidos nucleicos da amostra. A fragmentação aumenta a hibridização minimizando a hibridização da estrutura secundária e cruzada às outras moléculas de ácidos nucleicos da amostra na amostra ou às moléculas de ácidos nucleicos não complementares. A fragmentação pode ser realizada por meios mecânicos ou químicos.

Marcação

As moléculas de ácidos nucleicos da amostra ou as sondas podem ser marcadas com uma ou mais porções de marcação para permitir a detecção de complexos de arranjo hibridizado/moléculas de ácidos nucleicos da amostra. As porções de marcação podem incluir composições que podem ser detectadas por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, bioeletrônicos, imunoquímicos, elétricos, ópticos ou químicos. As porções de

marcação incluem radioisótopos, tal como (32)P, (33)P ou (35)S, compostos quimioluminescentes, proteínas de ligação marcadas, átomos de metais pesados, marcadores espectroscópicos, tais como marcadores e corantes fluorescentes, marcadores magnéticos, enzimas ligadas, marcações de espectrometria de massa, marcações de centrifugação, doadores e aceptores de transferência de elétrons e similares. Os marcadores fluorescentes preferidos incluem fluoróforos Cy3 e Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.).

Hibridização

A seqüência da molécula de ácido nucléico das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12, 13, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 ou outro CD163 que codifica as seqüências na técnica e fragmentos das mesmas pode ser utilizada em várias tecnologias de hibridização para várias finalidades. As sondas de hibridização podem ser planejadas ou derivadas de qualquer seqüência de CD163 de mamífero, mas pode fazer uso das seqüências descritas nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12, 13, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47. Tais sondas podem ser produzidas partindo de uma região altamente específica ou de um motivo conservado e utilizadas nos protocolos para a quantificação da mensagem, de variações alélicas e seqüências relacionadas a CD163. As sondas de hibridização da presente invenção podem ser de DNA ou de RNA e podem ser derivadas de qualquer seqüência de CD163 de mamífero conhecida na técnica ou partindo das seqüências descritas aqui como as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12, 13, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 30 ou de seqüências genômicas que incluem promotores, intensificadores e íntrons do gene de mamífero. As sondas de hibridização ou de PCR podem ser produzidas utilizando a oligomarkação, a translação de pequenos cortes, a marcação das extremidades ou a amplificação pela PCR na presença do nucleotídeo marcado. Um vetor que contém a seqüência de ácido nucléico pode ser utilizado para produzir uma sonda de mRNA *in vitro* através da adição de uma RNA polimerase e moléculas marcadas de ácidos nucléicos. Estes procedimentos podem ser realizados utilizando kits disponíveis comercialmente tais como os fornecidos pela Amersham Phar-

macia Biotech.

O rigor da hibridização é determinado pelo conteúdo de G+C da sonda, pela concentração de sais e pela temperatura. Em particular, o rigor pode ser aumentado reduzindo a concentração de sal ou aumentando a temperatura de hibridização. Nas soluções utilizadas para algumas hibridizações com base em membranas, a adição de um solvente orgânico tal como formamida permite que a reação ocorra a uma temperatura menor. A hibridização pode ser realizada em baixo rigor com tampões, tal como 5xSSC com 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 60°C, que permite a formação de um complexo de hibridização entre as seqüências de nucleotídeos que contêm alguns pareamentos errados. As lavagens subseqüentes são realizadas em maior rigor com tampões tal como 0,2xSSC com 0,1% de SDS a 45°C (rigor médio) ou a 68°C (rigor alto). Em rigor alto, os complexos de hibridização permanecerão estáveis somente quando as seqüências de ácidos nucléicos forem completamente complementares. Em algumas hibridizações com base em membranas, preferencialmente formamida a 35% ou mais preferencialmente a 50% pode ser adicionada à solução de hibridização para reduzir a temperatura em que a hibridização é realizada e os sinais de fundo podem ser reduzidos através do uso de outros detergentes tal como Sarkosil ou Triton X-100 e um agente de bloqueio tal como DNA de esperma de salmão. A seleção dos componentes e das condições para a hibridização é bem-conhecida pelos peritos na técnica e revisada em Ausubel (*supra*) e Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.

Os exemplos de condições de hibridização altamente rigorosas são como a seguir: hibridização a 42°C em uma solução de hibridização que compreende 50% de formamida, 1% de SDS, 1 M de NaCl, 10% de sulfato de Dextrana e lavagem duas vezes durante 30 minutos a 60°C em uma solução de lavagem que compreende 0,1 X SSC e 1% de SDS. É entendido na arte que condições de rigor equivalente podem ser atingidas através da variação da temperatura e do tampão ou da concentração de sais como descrito em Ausubel, e outros (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley &

Sons (1994), pp. 6.0.3 até 6.4.10. As modificações nas condições de hibridização podem ser determinadas empiricamente ou calculadas precisamente com base no comprimento e na porcentagem do pareamento de bases guanosina/citosina (GC) da sonda. As condições de hibridização podem ser calculadas como descrito em Sambrook, e outros, (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nova York (1989), pp. 9.47 até 9.51.

A especificidade de hibridização pode ser avaliada através da comparação da hibridização das moléculas de ácidos nucleicos de controle da especificidade com as moléculas de ácidos nucleicos da amostra de controle da especificidade que são adicionadas a uma amostra em uma quantidade conhecida. As moléculas de ácidos nucleicos no arranjo de controle da especificidade podem ter uma ou mais combinações erradas de sequência comparadas com as moléculas de ácidos nucleicos no arranjo correspondente. Desta maneira, é possível determinar se somente as moléculas de ácidos nucleicos no arranjo complementar se hibridizam com as moléculas de ácidos nucleicos da amostra ou se os duplícies híbridos com pareamento errado se formam.

As reações de hibridização podem ser realizadas em formatos de hibridização absolutos ou diferenciais. No formato de hibridização absoluto, as moléculas de ácidos nucleicos de uma amostra são hibridizadas com as moléculas em um formato em microarranjo e os sinais detectados após a formação dos complexos de hibridização se correlacionam com os níveis de moléculas de ácidos nucleicos em uma amostra. No formato de hibridização diferencial, é analisada a expressão diferencial de um conjunto de genes em duas amostras biológicas. Para a hibridização diferencial, as moléculas de ácidos nucleicos de ambas as amostras biológicas são preparadas e marcadas com grupamentos de marcação diferentes. Uma mistura das duas moléculas de ácidos nucleicos marcadas é adicionada em um microarranjo. O microarranjo é então analisado sob condições em que as emissões partindo de duas marcações diferentes podem ser detectadas individualmente. As moléculas no microarranjo que são hibridizadas com números equivalentes

de moléculas de ácidos nucleicos derivadas de ambas as amostras biológicas fornecem uma fluorescência combinada distinta (Shalon e outros; Publicação PCT WO95/35505). Em uma modalidade preferida, as marcações são marcadores fluorescentes com espectros de emissão que podem ser distinguidos, tais como os fluoróforos Cy3 e Cy5.

Após a hibridização, o microarranjo é lavado para remover moléculas de ácidos nucleicos não hibridizadas e é detectada a formação de complexos entre os elementos do arranjo que podem ser hibridizadas e as moléculas de ácidos nucleicos. Os métodos para a detecção da formação dos complexos são bem-conhecidos pelos peritos na técnica. Em uma modalidade preferida, as moléculas de ácidos nucleicos são marcadas com uma marcação fluorescente e a medida dos níveis e dos padrões de fluorescência indicativos da formação de complexos é realizada por microscopia fluorescente, preferencialmente microscopia fluorescente confocal.

Em um experimento de hibridização diferencial, as moléculas de ácidos nucleicos de duas ou mais amostras biológicas diferentes são marcadas com duas ou mais marcações fluorescentes diferentes com comprimentos de onda de emissão diferentes. Os sinais fluorescentes são detectados separadamente com fotomultiplicadores ajustados para detectar comprimentos de onda específicos. São obtidas as abundâncias/níveis de expressão das moléculas de ácidos nucleicos em duas ou mais amostras.

Tipicamente, as intensidades de fluorescência dos microarranjos podem ser normalizadas para levar em consideração as variações nas intensidades de hibridização quando mais de um microarranjo é utilizado sob condições de teste similares. Em uma modalidade preferida, as intensidades de hibridização dos complexos de moléculas de ácidos nucleicos individuais em arranjo são normalizadas utilizando as intensidades derivadas dos controles internos de normalização contidos em cada microarranjo.

Ensaio Baseados em Polipeptídeos

A presente invenção fornece métodos e reagentes para a detecção e para a quantificação de polipeptídeos CD163. Estes métodos incluem métodos bioquímicos analíticos tais como eletroforese, espectroscopia de

massa, métodos cromatográficos e similares ou vários métodos imunológicos tais como radioimunoensaio (RIA), ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs), ensaios imunofluorescentes, western blotting, espectrometria de massa com captura por afinidade, atividade biológica e outros descritos abaixo e evidentes para os peritos na técnica após a revisão desta descrição.

Ensaio Imunológico

A presente invenção fornece ainda métodos para a detecção de polipeptídeos CD163 que empregam um ou mais reagentes de anticorpo anti-CD163 (isto é, ensaios imunológicos). Como utilizado aqui, um ensaio imunológico é um ensaio que utiliza um anticorpo (como definido amplamente aqui e inclui especificamente fragmentos, quimeras e outros agentes de ligação) que se liga especificamente a um polipeptídeo ou um epítipo CD163.

São conhecidos vários formatos de ensaios de ligação imunológica bem estabelecidos adequados para a prática da invenção (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nºs 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; e 4.837.168). Ver, por exemplo, *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Asai, ed. Academic Press, Inc. Nova York (1993); *Basic and Clinical Immunology 7ª Edição*, Stites & Terr, eds. (1991); Harlow e Lane, *supra* [por exemplo, Capítulo 14] e Ausubel e outros, *supra*, [por exemplo, Capítulo 11]. Tipicamente, os ensaios de ligação imunológica (ou ensaios imunológicos) utilizam um "agente de captura" que se liga especificamente a e, freqüentemente, imobiliza o analito em uma fase sólida. Em uma modalidade, o agente de captura é um grupamento que se liga especificamente com um polipeptídeo ou uma subsequência CD163, tal como um anticorpo anti-CD163.

Geralmente, o produto do gene CD163 que é analisado é detectado direta ou indiretamente utilizando uma marcação que pode ser detectada. A marcação particular ou o grupo que pode ser detectado utilizado no ensaio não é geralmente um aspecto crítico da invenção, contanto que não interfira significativamente com a ligação específica do anticorpo ou dos anticorpos utilizados no ensaio. A marcação pode estar ligada covalentemente

ao agente de captura (por exemplo, um anticorpo anti-CD163) ou pode estar ligada a uma terceira porção, tal como um outro anticorpo, que se liga especificamente ao polipeptídeo CD163.

A presente invenção fornece métodos e reagentes para ensaios imunológicos competitivos e não competitivos para a detecção de polipeptídeos CD163. Os ensaios imunológicos não competitivos são ensaios em que a quantidade de analito capturado (neste caso CD163) é medida diretamente. Um tal ensaio é um ensaio imunológico com base monoclonal de dois sítios utilizando anticorpos monoclonais reativos a dois epítomos não interferentes no polipeptídeo CD163. Ver, por exemplo, Maddox e outros, 1983, J. Exp. Med., 158: 1211 para informação fundamental. Em um ensaio de "sanduíche", o agente de captura (por exemplo, um anticorpo anti-CD163) é ligado diretamente a um substrato sólido em que este fica imobilizado. Estes anticorpos imobilizados então capturam qualquer polipeptídeo CD163 presente na amostra de teste. O polipeptídeo CD163 imobilizado dessa forma pode ser então marcado, isto é, através da ligação com um segundo anticorpo anti-CD163 que carrega uma marcação. Alternativamente, o segundo anticorpo CD163 pode não possuir uma marcação, mas pode estar ligado a um terceiro anticorpo específico aos anticorpos da espécie da qual o segundo anticorpo é derivado. O segundo anticorpo, alternativamente, pode ser modificado com um grupamento que pode ser detectado, tal como a biotina, ao qual uma terceira molécula marcada pode se ligar especificamente, tal como estreptavidina marcada por enzima.

Nos ensaios competitivos, a quantidade de polipeptídeo CD163 presente na amostra é medida indiretamente através da medida da quantidade de um polipeptídeo CD163 (exógeno) deslocado (ou retirado por competição) de um agente de captura (por exemplo, anticorpo para CD163) pelo polipeptídeo CD163 presente na amostra. O ensaio de inibição com hapteno é um outro exemplo de um ensaio competitivo. Neste ensaio, o polipeptídeo CD163 é imobilizado em um substrato sólido. Uma quantidade conhecida de anticorpo para CD163 é adicionada na amostra e a amostra é então colocada em contato com o polipeptídeo CD163 imobilizado. Neste caso, a quanti-

dade de anticorpo anti-CD163 ligado ao polipeptídeo CD163 imobilizado é inversamente proporcional à quantidade de polipeptídeo CD163 presente na amostra. A quantidade de anticorpo imobilizado pode ser detectada através da detecção da fração imobilizada do anticorpo ou da fração do anticorpo
 5 que permanece em solução. Neste aspecto, a detecção pode ser direta, quando o anticorpo estiver marcado ou indireta quando a marcação estiver ligada a uma molécula que se liga especificamente ao anticorpo como descrito anteriormente.

Outros Formatos de Ensaio Baseados em Anticorpos

10 A invenção fornece ainda reagentes e métodos para a detecção e para a quantificação da presença do polipeptídeo CD163 na amostra através da utilização de um formato de immunoblot (Western blot). Um outro ensaio imunológico é a assim chamada "cromatografia de fluxo lateral". Em uma versão não competitiva de cromatografia de fluxo lateral, uma amostra
 15 se move através de um substrato, por exemplo, através da ação de capilares e encontra um anticorpo marcado móvel que se liga ao analito formando um conjugado. O conjugado então se move através do substrato e encontra um segundo anticorpo imobilizado que se liga ao analito. Assim, o analito imobilizado é detectado através da detecção do anticorpo marcado. Em uma ver-
 20 são competitiva de cromatografia de fluxo lateral uma versão marcada do analito se move através do veículo e compete com o analito não marcado para a ligação com o anticorpo imobilizado. Quanto maior a quantidade do analito na amostra, menor a ligação pelo analito marcado e, portanto, mais fraco é o sinal. Ver, por exemplo, May e outros, Patente U.S. Nº 5.622.871 e
 25 Rosenstein, Patente U.S. Nº 5.591.645.

Dependendo do ensaio, vários componentes, incluindo o antígeno, o anticorpo alvo ou o anticorpo anticatapsina S, podem ser ligados a uma superfície ou a um suporte sólido (isto é, um substrato, uma membrana ou um papel de filtro). Muitos métodos para a imobilização de biomoléculas a
 30 uma variedade de superfícies sólidas são conhecidos na técnica. Por exemplo, a superfície sólida pode ser uma membrana (por exemplo, nitrocelulose), uma placa para microtitulação (por exemplo, PVC, polipropileno ou poli-

estireno), um tubo de ensaio (vidro ou plástico), um bastão de imersão (por exemplo, vidro, PVC, polipropileno, poliestireno, látex e similares), um tubo de microcentrífuga ou uma esfera de vidro ou de plástico. O componente desejado pode estar ligado covalentemente ou não covalentemente através
5 de ligação não específica.

Uma ampla variedade de polímeros orgânicos e inorgânicos, tanto naturais quanto sintéticos pode ser empregada como o material para a superfície sólida. Os polímeros ilustrativos incluem polietileno, polipropileno, poli (4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli (tereftalato de etileno),
10 raion, náilon, poli (vinilbutirato), difluoreto de polivinilideno (PVDF), silicones, poliformaldeído, celulose, acetato de celulose, nitrocelulose e similares. Outros materiais que podem ser empregados, incluem papel, vidros, cerâmicas, metais, metalóides, materiais semicondutores, cimentos ou similares. Em adição, as substâncias que formam géis, tais como proteínas (por exemplo,
15 gelatinas), lipopolissacarídeos, silicatos, agarose e poliacrilamidas podem ser utilizadas. Os polímeros que formam várias fases aquosas, tais como dextranas, polialquilenos glicóis ou tensoativos, tais como fosfolipídeos, sais de alquil amônio de cadeia longa (12-24 átomos de carbono) e similares são também adequados. Quando a superfície sólida for porosa, vários tamanhos
20 de poros podem ser empregados dependendo da natureza do sistema.

Espectrometria de Massa

A massa de uma molécula pode ser freqüentemente utilizada como um identificador da molécula. Portanto, os métodos de espectrometria de massa podem ser utilizados para identificar um analito protéico. Os es-
25 pectrômetros de massa podem medir a massa através da determinação do tempo requerido para que um analito ionizado percorra um tubo com palhetas e que seja detectado por um detector de íons. Um método de espectrometria de massa para proteínas é a espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz ("MALDI"). Na MALDI, o analito é
30 misturado com um material de matriz que absorve energia que absorve a energia do comprimento de onda de um laser e colocado na superfície de uma sonda. Após atingir a matriz com o laser, o analito é dessorvido da su-

perfície da sonda, ionizado e detectado pelo detector de íons. Ver, por exemplo, Hillenkamp e outros, Patente U.S. Nº 5.118.937.

Outros métodos de espectrometria de massa para proteínas são descritos em Hutchens e Yip, Patente U.S. Nº 5.719.060. Em tal método referido como Superfícies Aumentadas para Captura por Afinidade ("SEAC")
5 um reagente de afinidade sólido que se liga especificamente ou não especificamente ao analito, tal como um anticorpo ou um íon metálico, é utilizado para separar o analito dos outros materiais em uma amostra. Então, o analito capturado é dessorvido da fase sólida, por exemplo, por energia a laser,
10 ionizado e detectado pelo detector.

Ácidos Nucléicos da Invenção

Os exemplos descrevem a descoberta dos presentes inventores de vários polinucleotídeos CD163 novos. A invenção inclui estes novos polinucleotídeos CD163. A presente invenção fornece vários novos polinucleotídeos isolados (por exemplo, seqüências de DNA e produtos da transcrição
15 do RNA, tanto filamentos senso quanto antisenso complementares, tanto de filamento simples quanto duplo, incluindo variações de processamento dos mesmos), que codificam novos polipeptídeos CD163. São relatados aqui novos polinucleotídeos isolados que codificam polipeptídeos CD163 suínos,
20 murinos, humanos, caninos e de macaco verde africano e que compreendem as seqüências apresentadas nas SEQ ID NOs: 1, 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47.

Deve ser reconhecido a descrição das SEQ ID NOs: 1, 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 fornece para um versado na técnica uma grande variedade de métodos de obtenção destas seqüências. Com a finalidade de exemplo, seria possível gerar sondas partindo
25 da seqüência descrita nas SEQ ID NOs: 1, 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 e selecionar bibliotecas de cDNA e genômicas suínas, murinas, humanas, caninas e de macaco verde africano e assim obter as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12, 13, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 33, 35, 37,
30 39, 41, 43, 45 e 47 inteiras ou seus equivalentes genômicos. Sambrook e outros, (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nova York (1989). Ainda com a finalidade de exemplo, um perito na técnica reconheceria imediatamente que fornecida a seqüência descrita nas SEQ ID NOs: 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 é então possível gerar os iniciadores apropriados para a amplificação pela PCR para a obtenção da seqüência inteira representada por estas seqüências. (Ver, por exemplo, PCR Technology, H. A. Erlich, ed., Stockton Press, Nova York, 1989; PCR Protocols: A Guide to Methods e Applications, M. A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky e Thomas J. White, eds., Academic Press, Inc., Nova York, 1990).

Os polinucleotídeos de DNA da invenção incluem cDNA e DNA que foram sintetizados quimicamente em um todo ou em parte e é também pretendido que incluam variações alélicas dos mesmos. As variações alélicas são formas modificadas de uma seqüência gênica do tipo selvagem, a modificação resultando da recombinação durante a segregação cromossômica ou da exposição às condições que dão origem à mutação genética. As variações alélicas, como os genes do tipo selvagem, são seqüências que ocorrem naturalmente (ao contrário das variações que não ocorrem naturalmente que surgem da manipulação *in vitro*).

As seqüências de DNA que codificam os novos polipeptídeos CD163 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47. O perito na técnica considerará rapidamente que o DNA da invenção compreende uma molécula de filamento duplo, por exemplo, a molécula que possui a seqüência apresentada nas SEQ ID Nos: 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 junto com com a molécula complementar (o "filamento não codificador" ou "complemento") que possui uma seqüência que pode ser deduzida da seqüência das SEQ ID NOs: 5, 12 13, 22, 23, 25, 26, 30 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 de acordo com as regras de pareamento de bases de Watson-Crick para o DNA. São ainda considerados pela invenção outros polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos CD163 suínos, murinos e de macaco verde africano das SEQ ID Nos: 2, 14, 24, 27 e 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 que diferem em seqüência do polinucleotídeo das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12, 13, 17, 18,

22, 23, 25, 26, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 em virtude da degeneração bem-conhecida do código genético universal, como é bem-conhecido na técnica. A presente invenção, portanto, considera outras moléculas de DNA e RNA que, na expressão, codificam os polipeptídeos das SEQ ID

5 NOs: 2, 14, 24, 27 e 32. Tendo identificado a sequência de resíduos de aminoácidos codificada pelo polipeptídeo suíno CD163 e com o conhecimento de todos os códons em tripleto para cada resíduo de aminoácido particular, é possível descrever todas as tais seqüências de RNA e de DNA codificadas. As moléculas de DNA e de RNA sem ser as descritas especificamente

10 aqui, caracterizadas simplesmente por uma alteração em um códon para um aminoácido particular aminoácido, estão, portanto, dentro do âmbito desta invenção.

Uma tabela de aminoácidos e de suas abreviações, símbolos e códons representativos é apresentada abaixo na Tabela 4 abaixo.

15 Tabela 4

Aminoácido	Abrev.	Símbolo	Códon(s)					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Ácido glutâmico	Glu	E	GAA	GAG				
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	Met	M	AUG					
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU

Aminoácido	Abrev.	Símbolo	Códon(s)					
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptofano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				

- Como é bem-conhecido na técnica, os códons constituem seqüências em triplete de nucleotídeos no mRNA e suas moléculas de cDNA correspondentes. Os códons são caracterizados pela base uracila (U) quando presentes em uma molécula de mRNA, mas são caracterizados pela base timidina (T) quando presentes no DNA. Uma alteração simples em um
- 5 códon para o mesmo resíduo de aminoácido dentro de um polinucleotídeo não alterará a seqüência ou a estrutura do polipeptídeo codificado. É evidente que quando uma frase citando que uma seqüência particular de 3 nucleotídeos "codifica" qualquer aminoácido particular, o versado na técnica reconhecerá que a tabela acima fornece um meio de identificação dos nucleotí-
- 10 deos particulares em questão. Com a finalidade de exemplo, se uma seqüência particular de três nucleotídeos codifica a treonina, a tabela acima divulga que as seqüências em triplete possíveis são ACA, ACG, ACC e ACU (ACT se no DNA).
- 15 A invenção inclui, portanto, um polinucleotídeo isolado que compreende:
- (a) uma seqüência de polinucleotídeo de susCD163v1 apresentada nas SEQ ID NOs: 1 e 5;
- (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui
- 20 pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 94%, 95%, 96% 97% 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 2;
- (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID:
- 25 2;
- (d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-

ende:

(a) uma sequência de polinucleotídeo de susCD163v2 apresentada na SEQ ID NO: 12 ou 13;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui
5 pelo menos 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 14;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID:
14;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de
10 (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-
ende:

(a) uma sequência de polinucleotídeo de CD63v2 murina apre-
sentada na SEQ ID NO: 22 ou 23;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID:
15 24;

(c) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de
(a) ou (b).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-
20 ende:

(a) uma sequência de polinucleotídeo de CD163v3 murina apre-
sentada na SEQ ID NO: 25 ou 26;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui
pelo menos 96% 97% 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um
25 polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 27;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID:
27;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de
(a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-
30 ende:

(a) uma sequência de polinucleotídeo de CD163v2 de macaco

verde africano apresentada na SEQ ID NO: 30 ou 31;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 32;

5 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 32;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-
10 ende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 33;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a
15 um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 34;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 34;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

20 A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-
ende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 35;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui
25 pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 36;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 36;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de
30 (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-
ende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 37;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a
5 um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 38;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 38;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

10 A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 39;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui
15 pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 40;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 40;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de
20 (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 41;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui
25 pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 42;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 42;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de
30 (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compre-

ende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 43;

5 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 44;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 44;

10 (d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 45;

15 (b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 46;

20 (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 46;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

A invenção inclui ainda um polinucleotídeo isolado que compreende:

25 (a) uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 47;

(b) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 30 48;

(c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SEQ ID: 49;

(d) um polinucleotídeo que é o complemento de qualquer um de (a), (b) ou (c).

A informação de seqüência de polinucleotídeo fornecida pela invenção torna possível a expressão em grande escala do polipeptídeo codificado através de técnicas bem-conhecidas e praticadas rotineiramente na técnica. Os polinucleotídeos da invenção permitem ainda a identificação e o isolamento de polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de CD163v1 suíno relacionados, tais como variações alélicas humanas e homólogos de espécie, através de técnicas bem-conhecidas incluindo hibridização por Southern e/ou por Northern e a reação em cadeia da polimerase (PCR).

O conhecimento da seqüência de qualquer uma das seqüências de CD163 descritas aqui também torna possível através do uso da hibridização por Southern ou da reação em cadeia da polimerase (PCR), a identificação de seqüências de DNA genômico que codificam seqüências reguladoras de CD163, tais como promotores, operadores, intensificadores, repressores e similares.

Como citado na seção anterior intitulada "Assays of the Invention", os polinucleotídeos da invenção também são úteis nos ensaios de hibridização para detectar a capacidade das células de expressar CD163 ou medir os níveis da expressão de CD163. Os polinucleotídeos da invenção também podem ser a base para os métodos de diagnóstico úteis para a determinação da susceptibilidade de um animal à infecção viral como descrito anteriormente.

A descrição contida aqui dos polinucleotídeos de comprimento completo que codificam um polipeptídeo CD163 torna facilmente disponíveis ao versado na técnica os fragmentos do polinucleotídeo de comprimento completo. A invenção fornece, portanto, fragmentos exclusivos do CD163 que codifica polinucleotídeos que compreendem pelo menos 15 ao longo do comprimento da seqüência de comprimento completo (incluído cada e todo o valor inteiro entre) nucleotídeos consecutivos de um polinucleotídeo que codifica um CD163 descrito aqui. Devido ao fato de que os polinucleotídeos da invenção (incluindo os fragmentos) compreendem seqüências exclusivas à

- seqüência de polinucleotídeo que codifica o CD163 particular, estes, portanto, se hibridizariam sob condições altamente rigorosas ou moderadamente rigorosas apenas (isto é, "especificamente") aos polinucleotídeos que codificam os vários polipeptídeos CD163. As seqüências exclusivas aos polinucleotídeos da invenção podem ser reconhecidas através da comparação de seqüências com outros polinucleotídeos conhecidos e podem ser identificadas através do uso de programas de alinhamento utilizados rotineiramente na técnica, por exemplo, os tornados disponíveis nos bancos de dados públicos de seqüências. Tais seqüências também podem ser reconhecidas partindo das análises de hibridização por Southern para determinar o número de fragmentos de DNA genômico aos quais um polinucleotídeo se hibridizará. Os polinucleotídeos da invenção podem ser marcados de uma maneira que permite a sua detecção, incluindo a marcação radioativa, fluorescente e enzimática.
- Um ou mais dos polinucleotídeos com fragmentos exclusivos (ou outros polinucleotídeos de CD163 como discutido anteriormente) podem ser incluídos em kits que são utilizados para detectar a presença de um polinucleotídeo que codifica CD163 ou utilizados para detectar variações em uma seqüência de polinucleotídeo que codifica CD163. São também tornados disponíveis pela invenção os polinucleotídeos antisentido que reconhecem e se hibridizam aos polinucleotídeos que codificam CD163. São fornecidos polinucleotídeos antisentido de comprimento completo e fragmentos. As moléculas de fragmento antisense da invenção incluem (i) aquelas que reconhecem e se hibridizam especificamente às variações de CD163 descritas aqui (que são determinadas pela comparação da seqüência do DNA que codifica CD163s ao DNA que codifica outras moléculas conhecidas). A identificação das seqüências exclusivas aos novos polinucleotídeos que codificam CD163 pode ser deduzida através do uso de qualquer banco de dados de seqüências disponível publicamente e/ou através do uso de programas de comparação de seqüências disponíveis comercialmente. A exclusividade das seqüências selecionadas em um genoma inteiro pode ser adicionalmente verificada através de análises de hibridização. Após a identificação das

seqüências desejadas, o isolamento através da digestão por restrição ou da amplificação utilizando qualquer uma das várias técnicas de reação em cadeia da polimerase bem-conhecidas na técnica pode ser realizado. Os Polinucleotídeos antisense são particularmente relevantes à expressão reguladora de CD163 pelas células que expressam o mRNA de CD163.

Os ácidos nucléicos antisense (preferencialmente oligonucleotídeos de 10 até 20 pares de bases) capazes de se ligarem especificamente às seqüências de controle da expressão de CD163 ou ao RNA de CD163 são introduzidos nas células (por exemplo, através de um vetor viral ou de um sistema de dispersão coloidal tal como um lipossomo). O ácido nucléico antisense se liga à seqüência de nucleotídeos alvo CD163 suína na célula e previne a transcrição ou a tradução da seqüência alvo. Os oligonucleotídeos antisense de fosforotioato e de metilfosfonato são especificamente considerados para o uso terapêutico pela invenção. Os oligonucleotídeos antisense podem ser adicionalmente modificados por poli-L-lisina, transferrina polilisina ou grupamentos de colesterol em sua extremidade a 5'. A supressão da expressão de CD163 suína em seu nível transcricional ou de tradução é útil para gerar modelos celulares ou animais para doenças caracterizadas pela expressão aberrante de CD163 suína ou como uma modalidade terapêutica.

Como observado anteriormente em maiores detalhes, os ácidos nucléicos da invenção incluem vetores que compreendem um polinucleotídeo da invenção. Tais vetores são úteis, por exemplo, para a amplificação dos polinucleotídeos nas células hospedeiras para criar quantidades úteis dos mesmos. Em outras modalidades, o vetor é um vetor de expressão em que o polinucleotídeo da invenção está ligado de forma operacional com um polinucleotídeo que compreende uma seqüência de controle da expressão. Tais vetores são úteis para a produção recombinante dos polipeptídeos da invenção.

Ainda como observado anteriormente, a invenção fornece células hospedeiras que são transformadas ou transfectadas (de forma estável ou transitória) com os polinucleotídeos da invenção ou com os vetores da invenção. Como citado anteriormente, tais células hospedeiras são úteis pa-

ra a produção de vírus e para a produção de vacinas.

A invenção fornece ainda polipeptídeos CD163 isolados codificados por um novo polinucleotídeo da invenção.

Polipeptídeos da Invenção

5 Os exemplos descrevem a descoberta dos presentes inventores de vários novos polipeptídeos CD163. A invenção inclui estes novos polipeptídeos CD163 que são apresentados nas SEQ ID NOs: 2, 14, 19, 24, 27, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 e 48.

A invenção inclui, portanto, um polinucleotídeo isolado que compreende um polipeptídeo susCD163v1 com a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 2.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 94%, 15 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 2.

A invenção inclui, portanto, um polinucleotídeo isolado que compreende um polipeptídeo susCD163v2 com a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 14.

20 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo sus CD163v2 apresentado na SEQ ID NO: 14.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo CD163v2 murino que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 24.

25 A invenção inclui ainda um polipeptídeo CD163v3 murino que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 27.

A invenção inclui ainda pelo menos um polipeptídeo que possui 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 27.

30 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 32.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos

98% ou 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 32.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 34.

- 5 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 34.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 36.

- 10 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 36.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 38.

- 15 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 39.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 40.

- 20 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 40.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 42.

- 25 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 42.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a seqüência apresentada na SEQ ID: 44.

- 30 A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 44.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a sequência apresentada na SEQ ID: 46.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou
5 similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 46.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui a sequência apresentada na SEQ ID: 48.

A invenção inclui ainda um polipeptídeo que possui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade e/ou
10 similaridade a um polipeptídeo apresentado na SEQ ID NO: 48.

Os polipeptídeos da invenção podem ser isolados de fontes naturais de células ou podem ser sintetizados quimicamente, mas são preferencialmente produzidos através de procedimentos recombinantes que envolvem as células hospedeiras da invenção. Espera-se que o uso de células
15 hospedeiras de mamíferos forneça tais modificações pós-tradução (por exemplo, glicosilação, truncamento, lipidação e fosforilação) que podem ser necessárias para conferir a atividade biológica ótima nos produtos de expressão recombinante da invenção. São abrangidas as formas glicosiladas e não glicosiladas dos novos polipeptídeos CD163.

20 A superexpressão em hospedeiros eucarióticos e procarióticos, como descrito anteriormente, facilita o isolamento de polipeptídeos CD163. A invenção inclui, portanto, polipeptídeos CD163 isolados como apresentado nas SEQ ID NOs: 2, 14, 19, 24, 27 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 e variações e substituições conservativas de aminoácidos contidas aqui incluindo
25 polipeptídeos marcados ou com adição de tag.

A invenção inclui novos polipeptídeos CD163 que são "marcados". O termo "marcado" é utilizado aqui para se referir à conjugação ou à ligação covalente de qualquer grupo adequado que possa ser detectado, incluindo enzimas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, beta-glucuronidase, fosfatase alcalina e beta-D-galactosidase), marcações fluorescentes (por exemplo, fluoresceína, luciferase) e marcações radioativas (por exemplo, ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{32}P e ^{35}S) ao composto que deve ser marcado. As
30

técnicas para a marcação de vários compostos, incluindo proteínas, peptídeos e anticorpos, são bem-conhecidas. Ver, por exemplo, Morrison, *Methods in Enzymology* 32b, 103 (1974); Syvanen e outros, *J. Biol. Chem.* 284, 3762 (1973); Bolton e Hunter, *Biochem. J.* 133, 529 (1973). O termo marca-

5 do também pode abranger um polipeptídeo que foi ligado covalentemente a uma marcação de aminoácido como discutido abaixo.

Em adição, os novos polipeptídeos CD163 da invenção podem ser marcados indiretamente. Isto envolve a adição covalente de uma porção ao polipeptídeo e o acoplamento subsequente da porção adicionada a uma

10 marcação ou a um composto marcado que exhibe ligação específica à porção adicionado. As possibilidades da marcação indireta incluem a biotinylation do peptídeo seguida pela ligação à avidina acoplada a um dos grupos de marcação anteriores. Um outro exemplo seria a incubação de um anticorpo específico marcado radioativamente para uma marcação de histidina com um

15 polipeptídeo CD163s que compreende uma marcação de polihistidina. O efeito líquido é a ligação do anticorpo radioativo ao polipeptídeo por causa da afinidade considerável do anticorpo pela marcação.

A invenção abrange ainda variantes (ou análogos) da nova proteína CD163. Em um exemplo, são fornecidas variações de inserção em que

20 um ou mais resíduos de aminoácidos suplementam uma nova sequência de aminoácidos de CD163. As inserções podem estar localizadas em qualquer um ou em ambos os terminais da proteína ou podem estar posicionadas dentro de regiões internas da nova sequência de aminoácidos da proteína CD163. As variações de inserção com resíduos adicionais em qualquer um

25 ou em ambos os terminais podem incluir, por exemplo, proteínas de fusão e proteínas incluindo tags ou marcações de aminoácidos. As variações de inserção incluem novos polipeptídeos CD163 em que um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados a uma sequência de aminoácidos de CD163 ou a um fragmento biologicamente vivo da mesma.

30 As variações de inserção, portanto, também podem incluir proteínas de fusão em que os terminais amino e/ou carbóxi do novo polipeptídeo CD163 estão fundidos a um outro polipeptídeo. Vários polipeptídeos de mar-

cação e seus respectivos anticorpos são bem-conhecidos na técnica. Os exemplos incluem marcações de poliistidina (poli-his) ou poliistidina-glicina (poli-his-gly); o polipeptídeo de marcação HA de influenza HA e seu anticorpo 12CA5 [Field e outros, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; a marcação c-myc e os anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 para a mesma [Evan e outros, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)] e a marcação da glicoproteína D do vírus Herpes Simplex (gD) e seu anticorpo [Paborsky e outros, *Protein Engineering*, 3(6): 547-553 (1990)]. Outros polipeptídeos de marcação incluem o peptídeo Flag [Hopp e outros, *BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)]; o peptídeo do epítipo KT3 [Martin e outros, *Science*, 255: 192-194 (1992)]; an alpha -tubulin epitope peptídeo [Skinner e outros, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; e a marcação do peptídeo da proteína do gene 10 T7 [Lutz-Freyermuth e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397(1990)]. Em adição, o polipeptídeo CD163 pode ser marcado com proteínas enzimáticas tal como a peroxidase e a fosfatase alcalina.

Em um outro aspecto, a invenção fornece variações de deleção em que um ou mais resíduos de aminoácidos em um novo polipeptídeo CD163 são removidos. As deleções podem ser realizadas em um ou em ambos os terminais do novo polipeptídeo CD163 ou com a remoção de um ou mais resíduos dentro da nova seqüência de aminoácidos de CD163. As variações de deleção, portanto, incluem todos os fragmentos do novo polipeptídeo CD163.

Os polipeptídeos CD163 contêm uma região de ancoramento transmembrana ou de membrana. Deve ser reconhecido que tais domínios transmembrana são úteis quando expressos no contexto de uma proteína heteróloga para auxiliar o direcionamento da proteína heteróloga às membranas. Deve também ser reconhecido que pode ser vantajoso deletar alguns domínios transmembrana para melhorar a purificação ou a solubilidade da proteína. As variações com deleção transmembrana de CD163 e os polinucleotídeos que as codificam possuem valor potencial como agentes terapêuticos antivirais. Tais variações são especificamente descritas aqui como as SEQ ID NOs: 37-40.

A presente invenção inclui ainda variações dos polipeptídeos mencionados anteriormente, isto é, polipeptídeos que variam da sequência de referência através de substituições conservativas de aminoácidos.

Os exemplos de substituições conservativas são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 na seção anterior intitulada "Definições".

Em tais situações em que é preferível isolar parcial ou completamente os novos polipeptídeos CD163, a purificação pode ser realizada utilizando métodos padronizados bem-conhecidos pelo perito na técnica. Tais métodos incluem, sem limitação, a separação por eletroforese seguida por eletroeluição, vários tipos de cromatografia (imunoafinidade, peneira molecular e/ou troca iônica) e/ou cromatografia líquida em alta pressão. Em alguns casos, pode ser preferível utilizar mais de um destes métodos para a purificação completa.

A purificação de novos polipeptídeos CD163 pode ser realizada utilizando uma variedade de técnicas. Se o polipeptídeo foi sintetizado de forma que contenha uma marcação tal como de Hexahistidina (CD163 /hexaHis) ou outro peptídeo pequeno tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, Conn.) ou myc (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) em qualquer um de seu terminal carboxila ou amino, este pode ser essencialmente purificado em um processo de uma única etapa passando a solução através de uma coluna de afinidade em que a matriz da coluna possui uma alta afinidade pela marcação ou pelo polipeptídeo diretamente (isto é, um anticorpo monoclonal que reconhece especificamente CD163). Por exemplo, a polihistidina se liga com grandes afinidade e especificidade ao níquel, assim uma coluna de afinidade de níquel (tal como as colunas de níquel TM registradas pela Qiagen) pode ser utilizada para a purificação de CD163/poliHis. (Ver, por exemplo, Ausubel e outros, eds., Current Protocols in Molecular Biology, Seção 10.11.8, John Wiley & Sons, Nova York [1993]).

Mesmo se o novo polipeptídeo CD163 for preparado sem uma marcação ou tag para facilitar a purificação, o novo CD163 da invenção pode ser purificado por cromatografia por imunoafinidade. Para realizar isto, os anticorpos específicos aos polipeptídeos CD163 têm que ser preparados por

meios bem-conhecidos na técnica.

Os anticorpos gerados contra os novos polipeptídeos CD163 da invenção podem ser obtidos através da administração dos polipeptídeos ou dos fragmentos que carregam epítomos, análogos ou células a um animal, preferencialmente um não humano, utilizando protocolos de rotina. Para a
5 preparação de anticorpos monoclonais, pode ser utilizada qualquer técnica conhecida na técnica que forneça anticorpos produzidos através de culturas de linhagens de células contínuas. Os exemplos incluem várias técnicas, tais como aquelas em Kohler, G. e Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975);
10 Kozbor e outros, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole e outros, pg. 77-96 em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Quando os novos polipeptídeos CD163 forem preparados sem uma marcação ligada e nenhum anticorpo estiver disponível, podem ser utilizados outros procedimentos bem-conhecidos para purificação. Tais proce-
15 dimentos incluem, sem limitação, cromatografia de troca iônica, cromatografia de peneira molecular, HPLC, eletroforese em gel nativo em combinação com a eluição do gel e a focalização isoeletrica preparatória ("Isopri-me" machine/technique, Hoefer Scientific). Em alguns casos, duas ou mais destas técnicas podem ser combinadas para atingir maior pureza.

20 Deve ser entendido que é pretendido que a definição de polipeptídeos da invenção inclua polipeptídeos que carregam modificações sem ser inserção, deleção ou substituição de resíduos de aminoácidos. Para a finalidade de exemplo, as modificações podem ter natureza covalente e incluem, por exemplo, ligação química com polímeros, lipídeos, outras porções orgâ-
25 nicas e inorgânicas.

Anticorpos

São também compreendidos pela presente invenção os anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais e policlonais, anticorpo de cadeia isolada, anticorpos quiméricos, anticorpos bifuncionais/biespecíficos, anti-
30 corpos humanizados, anticorpos humanos e anticorpos enxertados com a região determinadora de complementaridade (CDR), incluindo compostos que incluem seqüências CDR que reconhecem especificamente um polipep-

tídeo da invenção) específicos para o novo CD163 ou fragmentos do mesmo.

O termo "específico para", quando utilizado para descrever os anticorpos da invenção, indica que as regiões variáveis dos anticorpos da invenção reconhecem e se ligam exclusivamente aos polipeptídeos CD163s (isto é, são capazes de distinguir polipeptídeos CD163s dos outros polipeptídeos conhecidos em virtude das diferenças que podem ser medidas na afinidade de ligação, apesar da existência possível de identidade, homologia ou similaridade de sequência localizada entre o novo CD163 e tais polipeptídeos). Será entendido que os anticorpos específicos também podem interagir com outras proteínas (por exemplo, proteína A de *S. aureus* ou outros anticorpos em técnicas de ELISA) através de interações com seqüências fora da região variável dos anticorpos e, em particular, na região constante da molécula. As técnicas de seleção para determinar a especificidade de ligação de um anticorpo da invenção são bem-conhecidas e rotineiramente praticadas na técnica. Para uma discussão compreensiva de tais ensaios, ver Harlow e outros (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Os anticorpos que reconhecem e se ligam a fragmentos dos polipeptídeos CD163s da invenção também são considerados, contanto que os anticorpos sejam, em primeiro lugar e principalmente, específicos aos novos polipeptídeos CD163. Os anticorpos da invenção podem ser produzidos utilizando qualquer método bem-conhecido e rotineiramente praticado na arte. Os anticorpos não humanos podem ser humanizados através de quaisquer métodos conhecidos na técnica. Em um método, as CDRs não humanas são inseridas em um anticorpo humano ou em uma seqüência estrutural de consenso do anticorpo. Alterações adicionais podem então ser introduzidas na estrutura do anticorpo para modular a afinidade ou a imunogenicidade.

Os anticorpos da invenção são úteis para as finalidades de diagnóstico para detectar ou quantificar CD163s, assim como para a purificação de CD163s. Estão também compreendidos os kits que compreendem um anticorpo da invenção para qualquer uma das finalidades descritas aqui. Em

geral, um kit da invenção inclui ainda um antígeno de controle para o qual o anticorpo é imuno específico.

A presente invenção é adicionalmente ilustrada, mas não limitada, pelos exemplos a seguir.

5 Exemplo 1:

Transfecção transitória com CD163 suíno confere permissividade à infecção pelo vírus PRRS a uma linhagem de células não permissiva.

O mRNA total das células de macrófago alveolar suíno primário foi utilizado para construir uma biblioteca de cDNA no plasmídeo pCMV-Sport6.1 (Invitrogen), com o cDNA clonado entre os sítios *EcoRV* e *NotI*. Um membro desta biblioteca, quando isolado e transfectado de forma transitória na linhagem de células BHK-21 (rim de hamster bebê), confere um fenótipo permissivo ao PRRS. As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS) em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As culturas de células foram transfectada de forma transitória utilizando 10,0 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e 2,0 µg de plasmídeo. Uma monocamada em duplicata foi transfectada com o plasmídeo pPAMB de controle negativo. Este plasmídeo é o pCMV-Sport6.1 com um inserto faltando. A eficiência de transfecção foi monitorada com um plasmídeo expressando a proteína fluorescente verde (GFP). Aproximadamente 24 horas após a transfecção, as monocamadas foram infectadas com os genótipos norte-americanos (isolado P129) ou europeus (isolado 96V198) do vírus PRRS. Para a detecção da replicação de PRRS, as monocamadas foram fixadas utilizando 80% de acetona aproximadamente 24 horas após a infecção e incubadas durante aproximadamente 1 hora com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc.). Este anticorpo monoclonal é específico para o nucleocapsídeo viral de PRRS expresso partindo do quadro aberto de leitura 7. Um microscópio fluorescente invertido Nikon TE 300 com uma objetiva de 10x foi utilizado para fotografar uma monocamada que contém células positivas para FITC e uma monocamada de controle negativo.

Foi confirmado que as células transfectadas se tornam permissi-

vas para ambos os genótipos Norte-americanos (isolado P129) e Europeus (isolado 96V198) de PRRSV. A expressão dos genes virais pode ser detectada em muitas das células BHK transfectadas e a progênie viral era facilmente detectada no sobrenadante. As transfecções de controle utilizando o

5 vetor sem inserto ou plasmídeos irrelevantes não conferiam permissividade.

O seqüenciamento do inserto no plasmídeo funcional, utilizando o kit Big Dye Terminator Version 1.0 Sequence Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA) e o Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), revelou um gene que é altamente homólogo ao cDNA do gene

10 CD163 suíno publicado (Número de acesso do Genbank AJ311716). O cDNA que foi identificado continha regiões não traduzidas a 5' e a 3' adicionais em relação a AJ311716 e o quadro aberto de leitura diferia de três maneiras: (1) uma deleção interna de 738 pb próxima à extremidade a 5', (2) uma extensão de 15 pb da extremidade a 5' até um códon ATG a montante e (3)

15 dezesseis alterações de nucleotídeos previstas de causarem 10 alterações de aminoácidos. A identidade de seqüência de nucleotídeos entre as seqüências era de 99,4%. Os alinhamentos da seqüência CD163 suína recém-descoberta com a seqüência AJ311716 relatada anteriormente são mostrados nas figuras 1 e 2. A nova variação de CD163 suína foi denominada de

20 "susCD163v1"

SEQÜÊNCIA						ID NO
gtaataatac	aagaagattt	aatgggcat	aaaaccttgg	aatggacaaa	ctcagaatgg	60
tgctacatga	aaactctgga	tctgcagacc	tgaactgag	agtggtagat	ggagtcactg	120
aatgttcagg	aagattggaa	gtgaaattcc	aaggagaatg	gggaacaatc	tgtgatgatg	180
gctgggatag	tgatgatgcc	gctgtggcat	gtaagcaact	gggatgtcca	actgctgtca	240
ctgccattgg	tcgagttaac	gccagtggag	gaactggaca	catttggtt	gacagtgttt	300
cttgccatgg	acacgagtct	gctctctggc	agtgtagaca	ccatgaatgg	ggaaagcatt	360
attgcaatca	taatgaagat	gctggtgtga	catgttctga	tggatcagat	ctggaactga	420
gacttaaagg	tggaggcagc	cactgtgctg	ggacagtggg	ggtggaaatt	cagaaactgg	480
taggaaaagt	gtgtgataga	agctggggac	tgaaagaagc	tgatgtggtt	tgcaggcagc	540
tgggatgtgg	atctgcactc	aaaacatcat	atcaagttta	ttccaaaacc	aaggcaacaa	600
acacatggct	gtttgtaagc	agctgtaatg	gaaatgaaac	ttctctttgg	gactgcaaga	660
attggcagtg	gggtggactt	agttgtgatc	actatgacga	agccaaaatt	acctgctcag	720
cccacaggaa	acccaggctg	gttggagggg	acattccctg	ctctgggtcgt	gttgaagtac	780
aacatggaga	cacgtggggc	acgtctgtgt	attctgactt	ctctctggag	gcggccagcg	840
tgctgtgcag	ggaactacag	tgccggcactg	tggtttccct	cctgggggga	gctcactttg	900
gagaaggaag	tggacagatc	tgggtgaag	aattccagtg	tgaggggcac	gagtcccacc	960
tttcaactctg	cccagtagca	ccccgccctg	acgggacatg	tagccacagc	agggacgtcg	1020
gcgtagtctg	ctcaagatac	acacaaatcc	gcttggtgaa	tggcaagacc	ccatgtgaag	1080
gaagagtgga	gctcaacatt	cttgggtcct	gggggtccct	ctgcaactct	cactgggaca	1140
tggaagatgc	ccatgtttta	tgccagcagc	ttaaatgtgg	agttgccctt	tctatcccgg	1200
gaggagcacc	ttttgggaaa	ggaagtggag	aggtctggag	gcacatgttt	cactgcactg	1260
ggactgagaa	gcacatggga	gattgttccg	tcactgctct	gggcgcacat	ctctgttctt	1320
cagggcaagt	ggcctctgta	atctgctcag	ggaaccagag	tcagacacta	tccccgtgca	1380
attcatcatc	ctcggaccca	tcaagctcta	ttatttcaga	agaaaatggt	gttgcttgca	1440
tagggagtgg	tcaacttcgc	ctggtcgatg	gaggtggctg	ttgtgctggg	agagtagagg	1500

SEQUÊNCIA		ID NO
tctatcatga	gggctcctgg ggcaccatct gtgatgacag ctgggacctg aatgatgccc 1560	
atgtggtgtg	caaacagctg agctgtggat gggccattaa tgccactggt tctgtctatt 1620	
ttggggaagg	aacaggggcc atttggctgg atgagataaa ctgtaatgga aaagaatctc 1680	
atatttgga	atgccactca catgttggg ggcggcaca ttgcaggcat aaggaggatg 1740	
caggagtc	ctgctcggag ttcattgtctc tcagactgat cagtgaaac agcagagaga 1800	
cctgtgcagg	ggcctggaa gttttttaca acggagcttg gggcagcgtt ggcaagaata 1860	
gcatgtctcc	agccacagtg ggggtggtat gcaggcagct gggctgtgca gacagagggg 1920	
acatcagccc	tgcatcttca gacaagacag tgtccaggca catgtgggtg gacaatgttc 1980	
agtgtcctaa	aggacctgac accctatggc agtgcccatc atctccatgg aagaagagac 2040	
tggccagccc	ctcagaggag acatggatca catgtgcca caaaataaga cttcaagaag 2100	
gaaacactaa	ttgttctgga cgtgtggaga tctggtacgg aggttctctg ggcactgtgt 2160	
gtgacgactc	ctgggacctt gaagatgctc aggtggtgtg ccgacagctg ggctgtggct 2220	
cagcttttga	ggcaggaaaa gaggcgcctt ttggccaggg gactgggccc atatggctca 2280	
atgaagtga	gtgcaagggg aatgaaacct cctgttggga ttgtctctgc agatcctggg 2340	
gccacagtga	ctgtggacac aaggaggatg ctgtgtgac gtgttcagaa attgcaaaga 2400	
gccgagaatc	cctacatgcc acaggtcgct catcttttgt tgcacttgca atctttgggg 2460	
tcattctgtt	ggctgtctc atcgattcc tcatttggac tcagaagcga agacagaggc 2520	
agcggctctc	agttttctca ggaggagaga attctgtcca tcaaattcaa taccgggaga 2580	
tgaattcttg	cctgaaagca gatgaaacgg atatgtctaa tccctcagga gacctactg 2640	
aagtacaatg	aaaaggaaaa tgggaattat aacctggtga gttcagcctt taagatacct 2700	
tgatgaagac	ctggactatt gaatgagcaa gaatctgcct cttacactga agattacaat 2760	
acagtctctc	gtctcctggt attccaaaga ctgctgttga atttctaaaa aatagattgg 2820	
tgaatgtgac	tactcaaagt tgtatgtaag actttcaagg gcattaaata aaaaagaata 2880	
ttgctgaaaa	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2930	
1 M D K L R M V L H E N S G S A D L K L R 1 atggacaaactcagaatgggtgctacatgaaactctggatctgcagacctgaaactgaga 21 V V D G V T E C S G R L E V K F Q G E W 61 gtggtagatggagtcactgaatgttcaggaagattggaagtgaattccaaggagaaatgg 41 G T I C D D G W D S D D A A V A C K Q L 121 ggaacaactctgtgatgagtggtgggatagtgatgagtgccgctgtggcatgtaagcaactg 61 G C P T A V T A I G R V N A S E G T G H 181 ggaatgtcaactgctgtcactgcaattggctcgagtttaacgccagtgagggaaactggacac 81 I W L D S V S C H G H E S A L W Q C R H 241 atttggcttgacagtgtttcttggcatggacagagctgtgctctctggcagtgtagacac 101 H E W G K H Y C N H N E D A G V T C S D 301 catgaatgggaaagcattattgcaatcataatgaagatgctgggtgtgacatgtttctgat 121 G S D L E L R L K G G G S H C A G T V E 361 ggaatcagatctggaactgagactaaaggtggaggcagccactgtgctgggacagtgagag 141 V E I Q K L V G K V C D R S W G L K E A 421 gtggaaattcagaaactggtaggaaagtgtgtgatagaagctggggactgaaagaagct 161 D V V C R Q L G C G S A L K T S Y Q V Y 481 gatgtggtttgcaggcagctgggatgtgcatcctcaaaacatcatatcaagtttat 181 S K T K A T N T W L F V S S C N G N E T 541 tccaaaaccaaggcaacaacacatggctgtttgtgaagcagctgtaatggaaatgaaact 201 S L W D C K N W Q W G G L S C D H Y D E 601 tctcttttgggactgcaagaattggcagtggtgggacttagttgtgatcactatgacgaa 221 A K I T C S A H R K P R L V G G D I P C 661 gccaaaattacctgctcagccacaggaaaccaggctgggtggaggggacattccctgc 241 S G R V E V Q H G D T W G T V C D S D F 721 tctggtcgtgttgaagtacaactggagacagctggggcaccgtctgtgattctgacttc 261 S L E A A S V L C R E L Q C G T V V S L 781 tctctggaggcgccagcgtgtgtgcagggaactacagtgccgactgtggtttccctc 281 L G G A H F G E G S G Q I W A E E F Q C 841 ctgggggagctcactttggagaagggaagtgacagatctgggctgaagaattccagtg 301 E G H E S H L S L C P V A P R P D G T C 901 gaggggacagagctccacctttcactctgcccagtagcaccggccctgacgggacatgt 321 S H S R D V G V V C S R Y T Q I R L V N 961 agccacagcaggagcgtcgccgtagtctgctcaagatacacacaaatccgcttggtgaat 341 G K T P C E G R V E L N I L G S W G S L 1021 ggcaagaccccatgtgaaggaaagtgagctcaacattcttgggtcctgggggtccctc 361 C N S H W D M E D A H V L C Q Q L K C G 1081 tgcaactctcactgggacatggaagatgcccattgtttatgccagcagcttaaatgtgga 381 V A L S I P G G A P F G K G S E Q V W R 1141 gttgccctttctatccgggaggagcaccttttgggaagggaagtgtgagcaggtctggagg 401 H M F H C T G T E K H M G D C S V T A L 1201 cacatgtttcactgcactgggactgagaagcacatgggagattgttccgtcactgctctg 421 G A S L C S S G Q V A S V I C S G N Q S 1261 ggcgcactcactctgttcttcagggcaagtggcctctgtaatctgtcagggaaaccagagt 441 Q T L S P C N S S S S D P S S I I S E 1321 cagacactatccccgtgcaattcatcctcctcgaccatcaagctctattatttcagaa 461 E N G V A C I G S G Q L R L V D G G R 1381 gaaaatgtgttgcctgcataggagtggtcaacttcgctgtgcatggaggtggtcgt 481 C A G R V E V Y H E G S W G T I C D D S 1441 tgtgctgggagtagaggtctatcatgagggtcctggggcaccatctgtgatgacagc 501 W D L N D A H V V C K Q L S C G W A I N 1501 tgggacctgaatgatgcccattgtgtgtgcaaacagctgagctgtggatgggccaataat 521 A T G S A H F G E G T G P I W L D E I N 1561 gccactggttctgctcattttggggaaggaaacagggccattttggctggatgagataaac		SEQ ID NO:1 e 2

SEQÜÊNCIA		ID NO
541	C N G K E S H I W Q C H S H G W G R H N	
1621	tgtaatggaaaagaatctcatatttggcaatgccactcacatggttgggggcccgcacaat	
561	C R H K E D A G V I C S E F M S L R L I	
1681	tgcaggcataaggagatgcaggagtcacgtctcggagttcatgtctctcagactgac	
581	S E N S R E T C A G R L E V F Y N G A W	
1741	agtgaacacagcagagagacctgtgcaggcgccctggaagtttttacaacggagcttgg	
601	G S V G K N S M S P A T V G V V C R Q L	
1801	ggcagcggttggcaagaatagcatgtctccagccacagtgggggtggtatgcaggcagctg	
621	G C A D R G D I S P A S S D K T V S R H	
1861	ggctgtgcagacagaggggacatcagccctgcattcttcagacaagacagtgtccaggcac	
641	M W V D N V Q C P K G P D T L W Q C P S	
1921	atgtgggtggacaatgttcagtgctcctaaggacgtgacaccctatggcagtgcccatca	
661	S P W K K R L A S P S E E T W I T C A N	
1981	tctccatggaagaagagactggccagccctcagaggagacatggatcacatgtgccaac	
681	K I R L Q E G N T N C S G R V E I W Y G	
2041	aaaataagacttcaagaaggaaactaattgttctggacgtgtggagatctggtagcga	
701	G S W G T V C D D S W D L E D A Q V V C	
2101	ggttcctggggcactgtgtgtgacgactcctgggaccttgaagatgctcaggtggtgtgc	
721	R Q L G C G S A L E A G K E A A F G Q G	
2161	cgacagctgggctgtggctcagcttggaggcaggaagaggccgcatctggccagggg	
741	T G P I W L N E V K C K G N E T S L W D	
2221	actgggcccataatggctcaatgaagtgaagtgaagggaatgaaacctcctgtgggat	
761	C P A R S W G H S D C G H K E D A A V T	
2281	tgtcctgccagatcctggggccacagtgactgtggacacaaggagatgctgctgtgacg	
781	C S E I A K S R E S L H A T G R S S F V	
2341	tgttcagaaattgcaaagagccgagaatccctacatgccacaggtcgctcatctttgtt	
801	A L A I F G V I L L A C L I A F L I W T	
2401	gcacttgcaatcttggggctcattctgttggcctgtctcatcgattcctcatttggact	
821	Q K R R Q R Q R L S V F S G G E N S V H	
2461	cagaagcgaagacagaggcagcgctctcagttttctcaggaggagagaattctgtccat	
841	Q I Q Y R E M N S C L K A D E T D M L N	
2521	caaattcaataccgggagatgaattcttgcctgaaagcagatgaaacggatgctaata	
861	P S G D H S E V Q	
2581	ccctcaggagaccactctgaagtacaa	
1	MDKLRMLVHE NSGSADLKL R VVDGVTECSG RLEVKFQGEW GTICDDGWDS	SEQ ID NO:2
51	DDAAVACKQL GCPTAVTAIG RVNASEGTGH IWLDSVSCGH HESALWQCRH	
101	HEWGKHYCNH NEDAGVTCSD GSDLELRLKG GSHCAGTVE VEIQLVKGK	
151	CDRSWGLKEA DVVCRQLGCG SALKTSYQVY SKTKATNTWL FVSSCNGNET	
201	SLWDCKNWQW GGLSCDHDE AKITCSAHRK PRLVGGDIPC SGRVEVQHGD	
251	TWGTVCDSDF SLEAASVLCR ELQCGTVVSL LGGAHFGEGS GQIWAEEFQC	
301	EGHESHLSLC PVAPRPDGTG SHSRDVGVCV SRYTQIRLVN GKTPCEGRVE	
351	LNILGWSGSL CNSHWDMDA HVLCCQLKCG VALSIPGGAP FGKSGEQVWR	
401	HMFHCTGTEK HMGDCSVTAL GASLCSGGQV ASVICSGNQS QTLSPCNSSS	
451	SDPSSSIIE ENGVACIGSG QLRLVDGGR CAGRVEVYHE GSWGTICDDS	
501	WDLNDAHVVC KQLSCGWAIN ATGSAHFEGE TGPIWLDEIN CNGKESHIWQ	
551	CHSHGWGRHN CRHKEDAGVI CSEFMSLRLLI SENSRETCAG RLEVFNAGAW	
601	GSVGKNSMSP ATVGVCRCRL GCADRGDISP ASSDKTVSRH MWVDNVQCPK	
651	GPDTLWQCPS SPWKKRLASP SEETWITCAN KIRLQEGNTN CSGRVEIYWG	
701	GSWGTVCDDS WDLEDAQVVC RQLGCGSALE AGKEAAGFQG TGPIWLNEVK	
751	CKGNETSLLD CPARSWGHS CGHKEDAAVT CSEIAKSRES LHATGRSSFV	
801	ALAIFGVILL ACLIAFLIWT QKRRQRQLS VFSGGENSVH QIQYREMNNSC	
851	LKADETMLN PSGDHSEVQ	

Exemplo 2: Construção do plasmídeo pCMVsusCD163v1

A construção do plasmídeo pCMVsusCD163v1 foi realizada como a seguir. O clone funcional identificado na biblioteca de cDNA de macrófagos suínos primários como conferindo permissividade ao PRRSV serviu como molde para a amplificação pela PCR do inserto CD163, incluindo as regiões não traduzidas a 5' e a 3', utilizando os iniciadores 5'DS-CD163 (SEQ ID NO: 6) (5'-CGGAATTCCGCGGATGTAATAATACAAGAAGA-3') e 3' CD163 (SEQ ID NO: 7) (5'CCGCTCGAGTAGTCCAGGTCTTCATCAAGGTATC-TT-3'). O iniciador 5'DS-CD163 incorpora um sítio de restrição de *SacI* na extremidade a 5' do inserto CD163, enquanto o iniciador 3'CD163 incorpora

um sítio de restrição de *Xho*I na extremidade a 3' do inserto (sublinhado). As reações contendo 190 ng de molde plasmideal foram amplificadas utilizando a DNA polimerase Platinum *Pfx* (Invitrogen cat N° 11708-013) seguindo as instruções do fabricante. As reações foram aquecidas a 94° durante 2 minutos e então submetidas a 35 ciclos a 94° durante 20 segundos, 55° durante 30 segundos e 68° durante 3,5 minutos seguidos por uma extensão terminal a 72° durante 7 minutos. Os produtos da PCR resultantes foram purificados utilizando o kit de purificação Qiaquick (Qiagen cat N° 28104), digeridos com as enzimas de restrição *Sac*II e *Xho*I e os fragmentos resultantes foram purificados em gel utilizando o kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen cat N° 28704). O fragmento da PCR de CD163 foi então ligado no plasmídeo pCMV-Script (Stratagene cat N° 212220) preparado para aceitar o fragmento da PCR digerido através da digestão com *Sac*II e *Xho*I seguido pela purificação em como descrito anteriormente. O material ligado foi transformado na linhagem DH5 α de *E. coli* e os recombinantes foram selecionados através do crescimento em 50 μ g/mL de canamicina e identificados através da análise de restrição. O plasmídeo resultante, "pCMVsusCD163v1", contém o inserto CD163 suíno deletado internamente descrito no Exemplo sob o controle transcricional do promotor de CMV eucariótico e o gene de resistência à neomicina/canamicina sob o controle de promotores tanto eucarióticos quanto procarióticos.

Exemplo 3: Construção do vetor de expressão pRSV-Script e de pRSV-susCD163v1

O plasmídeo pRc/RSV (Invitrogen) foi utilizado como um molde para a amplificação pela PCR do promotor RSV. A sequência do promotor RSV estava contida dentro dos nucleotídeos 209 até 604 de pRc/RSV. O iniciador para frente PCIRSVLTR (SEQ ID NO: 8) (5'-ACACTCGACATGTCGATGTACGGGCCAGATATACGCGT-3') e o iniciador para trás VSRRTLSAC (SEQ ID NO: 9) (5'TTCCTTACAGAGCTCGAGGTGCACACCAATGTGGTGAA -3') foram sintetizados. Os sítios de reconhecimento das endonucleases de restrição *Pci*I e *Sac*I (sublinhados) foram incorporados nos iniciadores a 5' e a 3', respec-

tivamente, para futura clonagem. A PCR foi realizada utilizando o kit Hot-Master Taq DNA Polimerase (Eppendorf) seguindo as instruções do fabricante. As reações continham 0,9 ng do molde do plasmídeo pRc/RSV e 0,3 μ M de cada iniciador descrito anteriormente. As reações foram aquecidas a 94° durante 2 minutos e então submetidas a 30 ciclos a 94° durante 20 segundos, 52° durante 10 segundos e 65° durante 1 minuto. O fragmento de PCR resultante foi digerido com as enzimas de restrição *Pci* I e *Sac* I, purificado em gel e clonado no plasmídeo pCMV-Script (Stratagene) que foi similarmente digerido para remover a sequência promotora de CMV. O construto final colocou o promotor RSV imediatamente a montante do sítio de clonagem múltipla e foi nomeado de "pRSV-Script".

O inserto susCD163v1 foi clonado atrás do promotor RSV como a seguir. A sequência susCD163v1 foi cortada do plasmídeo pCMV-susCD163v1 através da digestão por restrição (*Kpn* I e *Sac* II) e purificada em gel. Este fragmento foi ligado no pRSV-Script que foi também digerido com as mesmas enzimas e purificado em gel. A mistura de ligação foi transferida para *E. coli* DH5 α e os transformantes foram selecionados utilizando canamicina a 50 μ g/mL. O clone contendo o inserto correto foi denominado de "pRSVsusCD163v1".

20 Exemplo 4: Clonagem e caracterização de uma variação mais longa do cDNA de CD163 suíno

Com base na sequência de CD163v1 suíno, um iniciador para frente ("forward primer") 5'CD163NotIlong (SEQ ID NO: 10) (5'CGGTCCGGAGCGGCCGCGATGTAATAATACAAGAAGATTAAATGG-3') e um iniciador reverso ("reverse primer") 3'CD163KpnI (SEQ ID NO: 11) (5'CGGTTGGTACCCAGCAATATTCTTTTTTATTTAATGCC-3') foram planejados utilizando o programa Lasergene PrimerSelect (DNASTAR Inc., Madison WI) para a amplificação de um gene CD163 suíno de comprimento completo. Os sítios de endonuclease de restrição para *Not* I e *Kpn* I (sublinhados) foram incluídos nos iniciadores a 5' e a 3', respectivamente, para permitir a clonagem conveniente. O RNA celular total foi preparado partindo de macrófagos alveolares primários (PAM) coletados de lavagens pulmonares

de porcos saudáveis. A preparação de RNA foi feita utilizando o kit RNeasy mini (Qiagen, Valencia, CA). As reações de RT-PCR foram preparadas utilizando a RT-PCR de uma única etapa SuperScript para o kit Long Templates kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) e os parâmetros de RT-PCR foram ajustados

5 como a seguir: 50°C durante 30 min, 94°C durante 2 min, (94°C 30 s, 55°C 30 s e 68°C 4 min) durante 35 ciclos, 72°C durante 10 min. Os produtos da PCR foram analisados em géis de agarose SeaKem GTG a 0,8%. Os produtos da RT-PCR de vários tamanhos foram cortados dos géis de agarose e o DNA foi extraído utilizando o kit GeneClean (QBiogene). Estes produtos da

10 RT-PCR foram clonados no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Os clones foram analisados através da digestão pela enzima de restrição em relação à presença de um inserto. As colônias contendo os insertos foram seqüenciadas utilizando o kit Big Dye Terminator Version 1.0 Sequence Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA) e o Applied Biosystems 3730 DNA

15 Analyzer (Applied Biosystems) para confirmar a autenticidade das seqüências. As seqüências foram editadas e montadas utilizando os programas Lasergene EditSeq e SeqMan programs (DNASTAR Inc., Madison WI). Um plasmídeo com um grande inserto foi denominado de "pCRsusCD163v2" (pCR2.1 contendo a variação 2 de CD163 suíno que foi denominado de SEQ

20 ID NO: 12). A seqüência codificadora contida na SEQ ID NO: 12 é reproduzida abaixo e é denominada de SEQ ID NO: 13. A análise de seqüência mostrou que este CD163 suíno codifica uma seqüência de aminoácidos de 1115 aminoácidos que foi denominada de SEQ ID NO: 14. Quando comparada com a seqüência de CD163 suíno no GenBank (Nº de Acesso

25 AJ311716), a seqüência CD163v2 dos presentes inventores é 98,9% idêntica no nível de aminoácidos. A CD163v2 também tem 5 resíduos de aminoácidos adicionais no terminal 5' extremo, estendendo o quadro aberto de leitura até um códon de início ATG a montante em quadro (como na seqüência CD163v1 suína descrita no exemplo 1). A CD163 suína é 84,3% idêntica à

30 CD163 humana (Nº de Acesso do Genbank Z22968) e 73,7% idêntica à CD163 de camundongo (Nº de Acesso do Genbank AF274883) no nível de aminoácido. A seqüência sinal prevista e a região transmembrana da SEQ

ID NO: 14 são indicadas em sublinhado e em negrito, respectivamente. A determinação do fato de que outras seqüências de CD163 contêm características de seqüência similares é feita através da inspeção da seqüência.

SEQÜÊNCIA						ID NO
gtaataatac	aagaagat	aaatggcata	aaaccttga	atggacaaac	tcagaatggt	60
gctacatgaa	aactctgga	ctgcagactt	tagaagatgt	tctgcccatt	taagttcctt	120
cacttttctg	gtagtcgctg	ttctcagtg	ctgcttggtc	actagtcttc	ttggaggaaa	180
agacaaggag	ctgaggctaa	cgggtggtga	aaacaagtgc	tctggaagag	tggaggtgaa	240
agtgcaggag	gagtggggaa	ctgtgtgtaa	taatggctgg	gacatggatg	tggctctctg	300
tgtttgtagg	cagctgggat	gtccaaactgc	tatcaaagcc	actggatggg	ctaatttttag	360
tgcaggttct	ggacgcattt	ggatggatca	tgtttcttgt	cgagggaatg	agtcagctct	420
ctgggactgc	aaacatgatg	gatggggaaa	gcataactgt	actcaccaac	aggatgctgg	480
agtaaacctgc	tcagatggat	ctgatttaga	gatggggctg	gtgaatggag	gaaaccggtg	540
cttaggaaga	atagaagtca	aatttcaagg	acgggtggga	acagtgtgtg	atgataactt	600
caacataaat	catgcttctg	tggtttgtaa	acaacttgaa	tgtggaagtg	ctgtcagttt	660
ctctggttca	gctaattttg	gagaaggttc	tggaccaatc	tggtttgatg	atcttgtatg	720
caatggaaat	gagtcagctc	tctggaactg	caaacatgaa	ggatggggaa	agcacaattg	780
cgatcatgct	gaggatgctg	gagtgatttg	cttaaatgga	gcagacctga	aactgagagt	840
ggtagatgga	gtcactgaat	gttcaggaag	attggaagtg	aaattccaag	gagaatgggg	900
aacaatctgt	gatgatggct	gggatagtga	tgatgccgct	gtggcatgta	agcaactggg	960
atgtccaact	gctgtcactg	ccattggctg	agttaacgcc	agtgagggaa	ctggacacat	1020
ttggcttgac	agtgtttctt	gccatggaca	cgagtctgct	ctctggcagt	gtagacacca	1080
tgaatgggga	aagcattatt	gcaatcatga	tgaagatgct	ggtgtgacat	gttctgatgg	1140
atcagatctg	gaactgagac	ttaaagggtg	aggcagccac	tgtgctggga	cagtggagggt	1200
tgaaattcag	aaactgtgag	gaaaagtgtg	tgatagaagc	tggggactga	aagaagctga	1260
tgtggtttgc	aggcagctgg	gatgtggatc	tgactcaaaa	acatcatatc	aagtttattc	1320
caaaaccaag	gcaacaaaca	catggctgtt	tgtaaagcag	tgtaatggaa	atgaaaactt	1380
tctttgggac	tgaagaattt	ggcagtgagg	tggacttagt	tgtgatcact	atgacgaagc	1440
caaaattacc	tgctcagccc	acaggaaacc	caggctgggt	ggaggggaca	ttccctgctc	1500
tggctggtgt	gaagtacaac	atggagacac	gtggggcacc	gtctgtgatt	ctgacttctc	1560
tctggaggcg	ccagcgtgc	tgtgcaggga	actacagtgc	ggcactgtgg	tttccctcct	1620
ggggggagct	cacttttgag	aaggaagtgg	acagatctgg	gctgaagaat	tccagtgtga	1680
ggggcacgag	tcccaccttt	cactctgccc	agtagcacc	cgccctgacg	ggacatgtag	1740
ccacagcagg	gacgtcgcg	tagtctgctc	aagatacaca	caaatccgct	tggatgaatg	1800
caagaccca	tgtgaaggaa	gagtgaggct	caacattctt	gggtcctggg	ggctccctctg	1860
caactctcac	tgggacatgg	aagatgcccc	tgttttatgc	cagcagctta	aatgtggagt	1920
tgccctttct	atcccgggag	gagcaccttt	tgggaaagga	agtgagcagg	tctggaggca	1980
catgtttcac	tgactggga	ctgagaagca	catgggagat	tgttccgtca	ctgctctggg	2040
cgcatcactc	tgttcttcag	gycagtggtc	ctctgtaatc	tgtctaggga	accagagtca	2100
gacactatct	ccgtgcaatt	catcatcctc	ggacccatca	agctctatta	tttcagaaga	2160
aaatgggtgt	gcttcgatag	ggagtgggtc	acttcgcctg	gtcgatggag	gtggctggtg	2220
tgctgggaga	gtagaggctc	atcatgagg	ctcctggggc	accatctgtg	atgacagctg	2280
ggacttgaa	gactgcgaat	tgggtgtcaa	acagctgagc	tgtggatggg	ccattaatgc	2340
cactgggtct	gctcattttg	gggaaggaa	agggccatt	tggctggatg	agataaactg	2400
taatggaaaa	gaatctcata	tttggaatg	ccactcacat	ggttgggggc	ggcacaattg	2460
caggcataag	gaggatgcag	gagtcacatg	ctcagagttc	atgtctctga	gactgatcag	2520
tgaaaacagc	agagagacct	gtgcaggggc	cctggaagtt	ttttacaacg	gagcttgggg	2580
cagcgttggc	aggaatagca	tgtctccagc	cacagtgggg	gtggatgca	ggcagctggg	2640
ctgtgcagac	agaggggaca	tcagccctgc	atcttcagac	aagacagtgt	ccaggcacat	2700
gtgggtggac	aatgttcagt	gtcctaaagg	acctgacaca	ctatggcagt	gcccatacat	2760
tccatggaag	aagagactgg	ccagcccctc	agaggagaca	tggatcacat	gtgccaacaa	2820
aataagactt	caagaaggaa	acactaattg	ttctggacgt	gtggagatct	ggtacggagg	2880
ttcctggggc	actgtgtgtg	acgactcctg	ggaccttgaa	gatgtcagg	tgggtgtccg	2940
acagctgggc	tgtggctcag	ctttggaggc	aggaagagag	gccgcatttg	gccaggggac	3000
tgggcccata	tggctcaatg	aagtgaagtg	caaggggaa	gaaacctcct	tgtgggattg	3060
tcctgccaga	tcctggggcc	acagtgactg	tggacacaag	gaggatgctg	ctgtgacgtg	3120
ctcagaaatt	gcaaaagacc	gagaatccct	acatgccaca	ggtcgctcat	cttttgtgtg	3180
acttgcaatc	tttggggtca	ttctgttggc	ctgtctcatc	gcattcctca	tttggactca	3240
gaagcgaaga	cagaggcagc	ggctctcagt	tttctcagga	ggagagaatt	ctgtccatca	3300
aattcaatac	cgggagatga	attcttgctt	gaaagcagat	gaaacggata	tgctaaatcc	3360
ctcaggagac	cactctgaag	tacaatgaaa	aggaaaaatg	gaattataac	ctgggtgagt	3420
cagccttta	gataccttga	tgaagacctg	gactattgaa	tgagcaagaa	tctgcctctt	3480
acactgaaga	ttacaataca	gtcctctgtc	tcctgggtatt	ccaaagactg	ctgctgaatt	3540
tctaagaaga	agattggtga	atgtgactac	tcaaagtgtg	atgtaagact	ttcaagggca	3600

SEQUÊNCIA		ID NO
ttaaataaaaa aagaatattg ctg	3623	
1 M D K L R M V L H E N S G S A D F R R C 1 atggacaaaactcagaatgggtgctacatgaaaactctggatctgcagactttagaagatgt 21 S A H L S S S F T F A V V A V L S A C L V 61 tctgccccatttaagttccttcacttttctgtagtcgctgttctcagtcctgcttggtc 41 T S S L G G K D K E L R L T G G G E N K C 121 actagttctcttggaggaaaagacaaggagctgaggctaacgggtgggtgaaaacaagtgc 61 S G R V E V K V Q E E W G T V C N N G W 181 tctggaagagtggagggtgaaagtgcaggaggagtggggaactgtgtgtaataatgggctgg 81 D M D V V S V V C R Q L G C P T A I K A 241 gacatggatgtggtctctgttgtttgtaggcagctgggatgtccaactgctatcaaagcc 101 T G W A N F S A G S G R I W M D H V S C 301 actggatgggctaatttttagtgcaggttcttgacgcatttggatggatcatgtttctgt 121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H N C 361 cgagggaatgagtcagctctctgggactgcaaacatgatggatggggaagcataactgt 141 T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M G L 421 actcaccaacaggatgctggagtaacctgctcagatggatctgatttagagatggggctg 161 V N G G N R C L G R I E V K F Q G R W G 481 gtgaatggaggaaaaccgggtgcttaggaagaatagaagtcaaatttcaaggacgggtggga 181 T V C D D N F N I N H A S V V C K Q L E 541 acagtggtgtgatataacttcaacataaatcatgcttctgtggtttgtaaacacttgaa 201 C G S A V S F S G S A N F G E G S G P I 601 tgtggaagtgtgtcagtttctctggttcagctaattttggagaagggttctggaccaatc 221 W F D D L V C N G N E S A L W N C K H E 661 tggtttgatgacttctgtatgcaatggaaatgagtcagctctctggaactgcaaacatgaa 241 G W G K H N C D H A E D A G V I C L N G 721 ggatggggaaagcacaaattgcgatcatgctgaggatgctggagtgtattgtttaaattgga 261 A D L K L R V V D G V T E C S G R L E V 781 gcagacctgaaactgagagtggtagatggagtcactgaatgttcaggaagattggaagt 281 K F Q G E W G T I C D D G W D S D D A A 841 aaattccaaggagaatggggaacaactctgtgatgatgggtgggatagtgtatgcccgt 301 V A C K Q L G C P T A V T A I G R V N A 901 gtggcatgtaagcaactgggatgtccaactgctgtcactgccattggtcgaggttaacgcc 321 S E G T G H I W L D S V S C H G H E S A 961 agtgagggaactggacacatttggcttgacagtgttcttgcacatggacacagagtctgct 341 L W Q C R H H E W G K H Y C N H D E D A 1021 ccttggcagtgtagacaccatgaatggggaagcattattgcaatcatgatgaagatgct 361 G V T C S S D G S D L E L R L K G G G S H 1081 ggtgtgacatgttctgtatggatcagatctggaactgagacttaaaagtggaggcagccac 381 C A G T V E V E I Q K L V G K V C D R S 1141 tgtgctgggacagtgagggtggaattcagaaactggtaggaaaagtgtgtgatagaagc 401 W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L K 1201 tggggactgaaagaagctgatgtggtttgcaggcagctgggatgtggatctgcactcaaa 421 T S Y Q V Y S K T K A T N T W L F V S S 1261 acatcatatcaagtttattccaaaaccaaggcaacaaacacatggctgtttgtaagcagc 441 C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L S 1321 tgtaatggaaatgaaacttctcttgggactgcaagaattggcagtggggtggacttagt 461 C D H Y D E A K I T C S A H R K P R L V 1381 tgtgtactactatgacgaagcaaaattacctgtcagccacaggaacccaggtgtgtt 481 G G D I P C S G R V E V Q H G D T W G T 1441 ggaggggacattccctgctctggtcgtgttgaaagtacaacatggagacagctggggcacc 501 V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q C 1501 gtctgtgattctgacttctctctggaggcggccagcgtgctgtgcagggaactacagtgc 521 G T V V S L L G G A H F G E G S G Q I W 1561 ggcactgtggtttccctctctgggggagctcactttggagaaggaagtggacagatctgg 541 A E E F Q C E G H E S H L S L C P V A P 1621 gctgaagaattccagtgtagggggcacgagtcacaccttctcactctgccagtagcaccc 561 R P D G T C S H S R D V G V V C S R Y T 1681 cgccctgacgggacatgtagccacagcagggacgtcgccgtagtctgtcgaagatacaca 581 Q I R L V N G K T P C E G R V E L N I L 1741 caaatccgcttggatggcaagaccccatgtgaaggaagagtggagctcaacattctt 601 G S W G S L C N S H W D M E D A H V L C 1801 gggctcctgggggtccctctgcaactctcactgggacatggaagatgccatgttttatgc 621 Q Q L K C G V A L S I P G G A P F G K G 1861 cagcagcttaaatgtggagttgcccttctatcccgggaggagcaccttttgggaaagga 641 S E Q V W R H M F H C T G T E K H M G D 1921 agtgagcaggtctggaggcacatgtttcactgcactgggactgagaagcacatgggagat 661 C S V T A L G A S L C S S G Q V A S V I 1981 tgttccgtcactgctctgggcgcacactctgttcttcaggggcaagtggcctctgtaact 681 C S G N Q S Q T L S P C N S S S S D P S 2041 tgcctcagggaaccagagtgcagacactatctccgtgcaattcatcatcctcgaccatca 701 S S I I S E E N G V A C I G S G Q L R L 2101 agctctattatttcagaagaaaatgggtgttgctgcatagggagtgggtcaacttcgctg 721 V D G G G R C A G R V E V Y H E G S W G 2161 gtcgatggaggtggtgctgtgtgctgggagagttagaggtctatcatgagggtcctggggc 741 T I C D D S W D L N D A H V V C K Q L S 2221 accatctgtgatgcagctgggacctgaatgatgcccatgtggtgtgcaaacagctgagc 761 C G W A I N A T G S A H F G E G T G P I 2281 tgtggatgggcattaatgccactgggttctgctcattttggggaaggaacagggccatt 781 W L D E I N C N G K E S H I W Q C H S H 2341 tggctgtagatgataaactgtaatggaaaagaatctcatatttggcaatgccactcacat 801 G W G R H N C R H K E D A G V I C S E F	SEQ ID NO:13 e 14	

SEQÜÊNCIA		ID NO
2401	ggttggggcgccacaaattgcaggcataaggagatgcaggagtcattctgctcagagttc	
821	M S L R L I S E N S R E T C A G R L E V	
2461	atgtctctgagactgatcagtgaaaacagcagagagacctgtgcagggcgccctggaagtt	
841	F Y N G A W G S V G R N S M S P A T V G	
2521	ttttacaacggagcttggggcagcggtggcaggaatagcatgtctccagccacagtgagg	
861	V V C R Q L G C A D R G D I S P A S S D	
2581	gtggatgcaggcagctgggctgtgcagacagaggggacatcagccctgcatcttcagac	
881	K T V S R H M W V D N V Q C P K G P D T	
2641	aagacagtgtccaggcacatgtgggtggacaatgttcagtgtcctaaaggacctgacaca	
901	L W Q C P S S P W K K R L A S P S E E T	
2701	ctatggcagtgcccatcatctccatggaagaagagactggccagccctcagaggagaca	
921	W I T C A N K I R L Q E G N T N C S G R	
2761	tggatcacatgtgccaacaaaataagacttcaagaaggaaacactaattgttctggacgt	
941	V E I W Y G G S W G T V C D D S W D L E	
2821	gtggagatctggtagcgaggttctctggggcactgtgtgtgacgactcctgggacctgaa	
961	D A Q V V C R Q L G C G S A L E A G K E	
2881	gatgctcaggtggtgtgccgacagctgggctgtggctcagcttggaggcaggaagag	
981	A A F G Q G T G P I W L N E V K C K G N	
2941	gccgcatgtggcaggggactgggcccattatggctcaatgaagtgaagtgaaggggaat	
1001	E T S L W D C P A R S W G H S D C G H K	
3001	gaaacctccttgggtgattgtctctgccagatcctggggccacagtgactgtggacacaag	
1021	E D A A V T C S E I A K S R E S L H A T	
3061	gaggatgctgtgtgacgtgtcagaaattgcaaagagccgagaatccctacatgccaca	
1041	G R S S F V A L A I F G V I L L A C L I	
3121	ggtcgtcatcttttgttgacttgcaatcttgggggtcattctgttggcctgtctcatc	
1061	A F L I W T Q K R R Q R Q R L S V F S G	
3181	gcattctcatttggactcagaagcgaagcagaggcagcggtctcagttttctcagga	
1081	G E N S V H Q I Q Y R E M N S C L K A D	
3241	ggagagaattctgtccatcaaattcaataccgggagatgaattcttgcctgaaagcagat	
1101	E T D M L N P S G D H S E V Q	
3301	gaaacggatatgctaaatccctcaggagaccactctgaagtacaa	
1	MDKLRMVLHE NSGSADFRRRC SAHLSSFTFA VVAVLSACLTV TSSLGGKDKE	SEQ ID NO:14
51	LRLTGGENKC SGRVEVKVQE EWGTVCNNGW DMDVVSUVCR QLGCPTAICA	
101	TDGANFSAGS GRIWMDHVSC RGNESALWDC KHDGWGKHNC THQQDAGVTC	
151	SDGSLEEMGL VNGGNRCLGR IEVKFQGRWG TVCDDNFNIN HASVVCQLE	
201	CGSAVSFSGS ANFGECSGPI WFDDLVCNGN ESALWNCKHE GWGKHNCDDHA	
251	EDAGVICLNG ADLKLRRVVDG VTECSGRLEV KFQGEWGTIC DDGWSDDAA	
301	VACKQLGCPT AVTAIGRVNA SEGTGHIWLD SVSCHGHESA LWQCRHHEWG	
351	KHYCNHDEDA GVTCSDGSDL ELRLKGGGSH CAGTVEVEIQ KLVGKVCDRS	
401	WGLKEADVVC RQLGCGSALK TSYQVYSKTK ATNTWLFVSS CNGNETSLWD	
451	CKNRQWQGLS CDHYDEAKIT CSAHRKPRLV GGDIPCSGRV EVQHGDWTGT	
501	VCDSDFSLEA ASVLCRELQC GTVVSLLGGA HFGECSGQIW AEEFQCEGHE	
551	SHLSLCPVAP RPDGTCSHSR DVGVCSTRYT QIRLVNGKTP CEGRVELNIL	
601	GSWGSCLNSH WDMEDAHVLC QQLKCGVALS IPGGAFFGKG SEQVWRHMFH	
651	CTGTEKHMGD CSVTALGASL CSSGQVASVI CSGNQSQTLs PCNSSSSSDPS	
701	SSIISEENG V ACIGSGQLRL VDGGRCRAGR VEYHEGWSW TICDDSWDLN	
751	DAHVVCKQLS CGWAINATGS AHFGEGTGPI WLDEINCNGK ESHIWQCHSH	
801	GWGRHNCRHK EDAGVICSEF MSLRLISENS RETCAGRLEV FYNGAWGSVG	
851	RNSMSPATVG VVCRQLGCAD RGDISPASSD KTVSRHMMVD NVQCPKGPDT	
901	LWQCPSSPWK KRLASPSEET WITCANKIRL QEGNTNCSGR VEIWIYGGSWG	
951	TVCDSDWDL E DAQVVCRLG CGSALEAGKE AAFQGTGPI WLNEVKCKGN	
1001	ETSLWDCPAR SWGHSDCGHK EDAAVTCSEI AKSRESLHAT GRSSFVALAI	
1051	FGVILLACLI AFLIWTQKRR QRQLSVFRWG TENSVDHIQY REMNSCLKAD	
1101	ETDMLNPSGD HSEVQ	

O Sus CD163 v2 no pCRsusCD163v2 foi liberado do vetor p-CR2.1 após a digestão com as enzimas de restrição *Kpn* I e *Not* I e a purificação em gel. O vetor receptor pCMV-script também foi cortado com o mesmo par de enzimas de restrição e permitido à clonagem direcional de susCD163v2 no pCMV-script. Após a ligação de susCD163 v2 com pCMV-script, a mistura ligada foi utilizada para transformar células de *E. coli* STBL 2 (Invitrogen). Foi observado que um transformante continha o gene CD163 através da análise com as enzimas de restrição e foi denominado de pCMV-script susCD163v2 clone Nº 3.

Exemplo 5: Preparação de um sistema de expressão baseado no promotor RSV através do método de ligação direta e de transfecção.

Foi desenvolvido um procedimento não baseado na clonagem para gerar quantidades em micrograma de DNA linear adequado para uso na produção de linhagens de células estáveis expressando CD163 partindo de um promotor RSV (figura 4). O procedimento envolve o isolamento e a ligação de dois pedaços de DNA, um que contém o gene da neomicina e o cassete do promotor RSV derivado do pRSV-script e o outro que contém a seqüência codificadora de susCD163v2 do pCMVsusCD163v2. O plasmídeo do vetor pRSV-Script foi linearizado com *DraIII* a montante do gene da neomicina e as pontas foram tornadas cegas com o fragmento de Klenow da DNA polimerase de *E. coli*. Este plasmídeo foi então digerido com *NotI* imediatamente a jusante do promotor RSV. O clone pCMVsusCD163v2 foi digerido na seqüência do vetor a jusante do inserto CD163 com *DrdI* e as pontas foram tornadas cegas com o fragmento de Klenow da DNA polimerase. A seqüência codificadora de CD163 foi liberada do vetor com um *NotI* localizado a montante da seqüência codificadora de CD163. Para a digestão de cada plasmídeo os fragmentos apropriados foram purificados dos géis de agarose. Uma reação de ligação em grande escala foi realizada como a seguir. Aproximadamente 20 µg de cada fragmento de DNA foram incubados em um volume de 600 µL com 15 unidades de T4 DNA ligase. A reação foi incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos, em cujo período de tempo uma alíquota foi removida e a reação foi congelada em gelo seco. A análise do gel de agarose da alíquota revelou que permanecia uma quantidade significativa de DNA não ligado, assim mais 15 unidades de ligase foram adicionadas e incubadas durante mais 10 minutos à temperatura ambiente. Após a ligação, um pedaço linear de DNA que contém todos os elementos apropriados foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A ligação dos dois fragmentos de DNA através dos terminais coesivos de *NotI* resultou na colocação das seqüências a 5' do gene CD163 a jusante do promotor RSV, permitindo a expressão direcionada de CD163 em células de mamíferos. Uma vez isolado, o DNA purificado foi utilizado para transfectar várias linha-

gens de células de mamíferos.

Exemplo 6: Clonagem e caracterização do cDNA de CD163 humano

Com base em uma sequência de cDNA de CD163 humano (Nº de Acesso do GenBank BC051281), um iniciador para frente Hu5'Not (SEQ ID NO: 15)

(5'CACCGCGGCCGCGAAGTTATAAATCGCCACCATGAGCAA ACTCAGAATGG-3') e um iniciador para trás Hu3'Kpn (SEQ ID NO: 16)

(5'-TGCTCCGGTACCTAGTCCAGGTCTTCATCAAGGTATCTTA-3') foram planejados utilizando o programa PrimerSelect. Os sítios de restrição para *NotI* e *KpnI* (sublinhados) foram incorporados nos iniciadores a 5' e a 3', respectivamente, para facilitar a clonagem nos vetores de expressão. A sequência CACC foi adicionada na extremidade a 5' do iniciador a 5' para permitir a clonagem direcional no vetor pCDNA3.1D/V5/His/TOPO (Nº de Cat. K49001, Invitrogen, ver a figura 6). Os cDNAs de CD163 humano foram amplificados partindo do RNA extraído da linhagem de células U937 após serem estimuladas com 12-miristato 13-acetato de forbol (100 ng/mL) durante 3 dias. O RNA celular total foi separado utilizando o kit RNeasy (Qiagen). As reações de RT-PCR e os métodos de seqüenciamento eram os mesmos que foram descritos no Exemplo 4. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose SeaKem a 0,8% e extraídos do gel utilizando o kit GeneClean. Os produtos da PCR foram clonados de forma direcionada no vetor pCDNA3.1D/V5/His/TOPO seguindo as instruções do fabricante. Dois clones com grandes insertos foram seqüenciados. Os métodos de seqüenciamento e de análise de seqüência foram descritos no Exemplo 4. Um clone com um inserto corrigido foi denominado de "pcDNA3.1D-humCD163v2" e foi denominada a seqüência do inserto da SEQ ID NO: 17.

O quadro aberto de leitura de CD163 no pCDNA3.1D-humCD163v2 tem 1121 resíduos de comprimento (denominado da SEQ ID NO: 18 que codifica a SEQ ID NO:19 descrita abaixo) e é 100% idêntica a Genbank Z22968 (um cDNA de CD163 humano do mesmo comprimento). A seqüência de CD163v2 humano dos presentes inventores é também 100% idêntica a Genbank BC051281 e Z22969 (variações de processamento do

CD163 humano) exceto pelo fato de que 42 resíduos não homólogos nas duas seqüências do Genbank seqüências substituem os sete resíduos carbóxi-terminais da seqüência dos presentes inventores. Esta diferença é causada pela presença de um éxon de 83 nucleotídeos em BC051281 e em Z22969 e pela alteração de quadro resultante na extremidade a 31 do éxon.

(Law, S.K., Micklem, K.J., Shaw, J.M., Zhang, X.P., Dong, Y., Willis, A.C. e Mason, D.Y. (1993) A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *European Journal of Immunology* 23 (9), 2320-2325).

SEQÜÊNCIA						ID NO
atgagcaaac	tcagaatggt	gctacttgaa	gactctggat	ctgctgactt	cagaagacat	60
tttgtcaacc	tgagtccect	caccattact	gtggctcttac	ttctcagtg	ctgttttgtc	120
accagttctc	ttggaggaac	agacaaggag	ctgaggctag	tggatggtga	aaacaagtgt	180
agcgggagag	tggaagtga	agtccaggag	gagtggggaa	cggtgtgtaa	taatggctgg	240
agcatggaag	cggtctctgt	gatttgtaac	cagctgggat	gtccaactgc	tatcaaagcc	300
cctggatggg	ctaattccag	tgcaggttct	ggacgcattt	ggatggatca	tgtttcttgt	360
cgtgggaatg	agtcagctct	ttgggattgc	aaacatgatg	gatggggaaa	gcatagtaac	420
tgtactcacc	aacaagatgc	tggagtgaac	tgtcagatg	gatccaattt	ggaaatgagg	480
ctgacgcgtg	gagggaaat	gtgttctgga	agaatagaga	tcaaattcca	aggacggtgg	540
ggaacagtgt	gtgatgata	cttcaacata	gatcatgcat	ctgtcatttg	tagacaactt	600
gaatgtggaa	gtgctgtcag	tttctctggt	tcatctaatt	ttggagaagg	ctctggacca	660
atctggtttg	atgatcttat	atgcaacgga	aatgagtcag	ctctctggaa	ctgcaaacat	720
caaggatggg	gaaagcataa	ctgtgacct	gctgaggatg	ctggagtgat	ttgctcaaag	780
ggagcagatc	tgagcctgag	actggtagat	ggagtcactg	aatgttcagg	aagattagaa	840
gtgagattcc	aaggggaatg	ggggacaata	tgtgatgacg	gctgggacag	ttacgatgct	900
gctgtggcat	gcaagcaact	gggatgtcca	actgccgtca	cagccattgg	tcgagttaac	960
gccagtaagg	gatttggaca	catctggcct	gacagcggtt	cttgccaggg	acatgaacct	1020
gctgtctggc	aatgttaaaca	ccatgaatgg	ggaaagcatt	attgcaatca	caatgaagat	1080
gctggcgtga	tggtttctga	tggtatcagat	ctggagctaa	gacttagagg	tggaggcagc	1140
cgctgtgctg	ggacagttga	ggtggagatt	cagagactgt	tagggaaggt	gtgtgacaga	1200
ggctggggac	tgaagaagc	tgatgtggtt	tgcaggcagc	tgggatgtgg	atctgcactc	1260
aaaacatctt	atcaagtgt	ctccaaaatc	caggcaacaa	acacatggct	gtttctaagt	1320
agctgtaacg	gaaatgaac	ttctcttttg	gactgcaaga	actggcaatg	gggtggactt	1380
acctgtgatc	actatgaaga	agccaaaatt	aactgtcag	cccacaggga	accagactg	1440
gttgagggtg	acattccctg	ttctggacgt	gttgaagtga	agcatgggtg	cacgtggggc	1500
tccatctgtg	attcggactt	ctctctggaa	gctgccagcg	ttctatgcag	ggaattacag	1560
tgtggcacag	ttgtctctat	cctgggggga	gctcactttg	gagagggaaa	tggacagatc	1620
tgggctgaag	aattccagtg	tgaggacat	gagtcaccat	tttactctg	cccagtagca	1680
ccccgccag	aaggaacttg	tagccacagc	agggatgttg	gagtagtctg	ctcaagatac	1740
acagaaattc	gcttggtgaa	tggcaagacc	ccgtgtgagg	gcagagtggg	gctcaaaacg	1800
cttgggtgct	ggggatccct	ctgtaactct	cactgggaca	tagaagatgc	ccatgttctt	1860
tgccagcagc	ttaaattgtg	agttgccctt	tctaccccag	gaggagcagc	ttttggaaaa	1920
ggaaatggtc	agatctggag	gcatatgttt	cactgcactg	ggactgagca	gcacatggga	1980
gattgtcctg	taactgtctt	aggtgcttca	ttatgtcctt	cagagcaagt	ggcctctgta	2040
atctgctcag	gaaaccagtc	ccaaacactg	tcctctgtga	attcatcgct	tttgggcccc	2100
acaaggccta	ccattccaga	agaaagtgt	gtggcctgca	tagagagtgg	tcaacttcgc	2160
ctggtaaatg	gaggaggtcg	ctgtgctggg	agagttagaga	tctatcatga	gggctcctgg	2220
ggcaccatct	gtgatgacag	ctgggacctg	agtgatgccc	acgtggtttg	cagacagctg	2280
ggctgtggag	aggccattaa	tgccactggt	tctgctcatt	ttggggaagg	aacaggggccc	2340
atctggctgg	atgagatgaa	atgcaatgga	aaagaatccc	gcatttggca	gtgccattca	2400
cacggctggg	ggcagcaaaa	ttgcaggcac	aaggaggatg	cgggagtatt	ctgctcagaa	2460
ttcatgtctc	tgagactgac	cagtgaagcc	agcagagagg	cctgtgcagg	gcgtctggaa	2520
gttttttaca	atggagcttg	gggcactggt	ggcaagagta	gcatgtctga	aaccactgtg	2580
gggtgtggtg	gcaggcagct	gggtgtgca	gacaaaggga	aaatcaaccc	tgcattctta	2640
gacaaggcca	tgtccattcc	catgtgggtg	gacaatgttc	agtgtccaaa	aggacctgac	2700
acgtgtggc	agtgcaccat	atctccatgg	gagaagagac	tggccagccc	ctcggaggag	2760
acctggatca	catgtgacaa	caagataaga	cttcagggaag	gacccacttc	ctgttctgga	2820
ctgtgtggga	tctggcatgg	aggttctctg	gggacagtgt	gtgatgactc	ttgggacttg	2880

SEQUÊNCIA			ID NO
gacgatgctc aggtggtgtg tcaacaactt ggctgtggtc cagctttgaa agcattcaaa	2940		
gaagcagagt ttggtcaggg gactggaccg atatggctca atgaagtga gtgcaaaggg	3000		
aatgagtctt ccttgtggga ttgtcctgcc agacgctggg gccatagtga gtgtggggcac	3060		
aaggaagacg ctgcagtga ttgcacagat atttcagtgc agaaaacccc acaaaaagcc	3120		
acaacaggtc gctcatcccg tcagtcattc tttattgcag tcggggtcct tgggggtgtt	3180		
ctgttggcca ttttcgtcgc attattcttc ttgactaaaa agcgaagaca gagacagcg	3240		
cttgagttt cctcaagagg agagaactta gtccacaaa ttcaataccg ggagatgaat	3300		
tcttgctga atgcagatga tctggaccta atgaattcct caggaggcca ttctgagcca	3360		
cactgaaaag gaaaatggga atttataacc cagtgaagtc agcctttaag ataccttgat	3420		
gaagacctgg acta	3434		
1 M S K L R M V L L E D S G S A D F R R H			SEQ ID
1 atgagcaaaactcagaatggtgctacttgaagactctggatctgctgacttcagaagacat			NO:18 e
21 F V N L S P F T I T V V L L L S A C F V			19
61 tttgtcaacctgagtccttccaccattactgtggtcttacttctcagtgctgtttgtc			
41 T S S L G G T D K E L R L V D G E N K C			
121 accagttctcttggaggaacagacaaggagctgaggtagtgatggtgaaacaagtgt			
61 S G R V E V K V Q E E W G T V C N N G W			
181 agcgggagagtggaaagtgaagtcaggaggagtgagggaacgggtgtgtaataatggctgg			
81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A			
241 agcatggaagcggctctctgtgatttgaaccagctgggatgtccaactgctatcaaagcc			
101 P G W A N S S A G S G R I W M D H V S C			
301 cctggatgggctaattccagtgacggttctggacgcatttggatggatcatgtttctgt			
121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N			
361 cgtgggaatgagtcagctcttgggattgcaaacatgatggatggggaagcatagtaac			
141 C T H Q Q D A G V T C S D G S N L E M R			
421 tgtactcaccaacaagatgctggagtgacctgctcagatggatccaatttggaaatgagg			
161 L T R G G N M C S G R I E I K F Q G R W			
481 ctgacgcgtggagggaaatgtgttctggaagaatagagatcaaattccaaggacgggtgg			
181 G T V C D D N F N I D H A S V I C R Q L			
541 ggaacagtggtgatgataacttcaacatagatcatgcatctgctcattttagtaacaactt			
201 E C G S A V S F S G S S N F G E G S G P			
601 gaatgtggaagtgtgtcagtttctctggttcatctaatttggagaaggctctggacca			
221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H			
661 atctggtttgatgatcttatatgcaacggaaatgagtcagctcttgggaactgcaaacat			
241 Q G W G K H N C D H A E D A G V I C S K			
721 caaggtggggaagcataactgtgaccatgctgaggatgctggagtgatttctgctcaag			
261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E			
781 ggagcagatctgagcctgagactggtatgagtgagtcactgaatgttcaggaagattagaa			
281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S Y D A			
841 gtgagattccaaggggaatgggggacaatatgtgatgacggctgggacagttacgatgct			
301 A V A C K Q L G C P T A V T A I G R V N			
901 gctgtggcatgcaagcaactgggatgtccaactgccgtcacagcatttggctgagttaac			
321 A S K G F G H I W L D S V S C Q G H E P			
961 gccagtaagggatttggacacatctggcttgacagcgttcttggcagggacatgaacct			
341 A V W Q C K H E W G K H Y C N H N E D			
1021 gctgtctggcaatgtaaacaccatgaatggggaaagcattattgcaatcacaatgaagat			
361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G S			
1081 gctggcgtgacatgttctggtgatcagatctggagctaagacttagaggtggaggcagc			
381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R			
1141 cgctgtgctgggacagttgaggtggagattcagagactgttagggaaaggtgtgtgacaga			
401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L			
1201 ggctggggactgaaagaagctgatgtggtttgcaggcagctgggatgtggatctgcactc			
421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N T W L F L S			
1261 aaaacatcttatcaagtgtactccaaaatccaggcaacaaacacatggctgtttctaatg			
441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L			
1321 agctgtaacggaaatgaaacttctcttgggactgcaagaactggcaatggggtggactt			
461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L			
1381 acctgtgatcactatgaagaagccaaaattacctgctcagcccacagggaaccagactg			
481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G			
1441 gttggaggggacattccctgttcttgacgtgttgaagtgaagcatggtgacacgtggggc			
501 S I C D S D F S L E A A S V L C R E L Q			
1501 tccatctgtgattcggacttctcttggaaagctgccagcgttctatgcaggggaattacag			
521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I			
1561 tgtggcacagttgtctctatctctggggggagctcactttggagagggaaatggacagatc			
541 W A E E F Q C E G H E S H L S L C P V A			
1621 tgggctgaagaattccagtggtgagggacatgagtcaccttcttactctgcccagtagca			
561 P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y			
1681 ccccgccagaaaggaacttgtagccacagcagggatgttggagtagtctgctcaagatc			
581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T			
1741 acagaaattcgcttggtgaatggcaagaccccggtgtgagggcagagtgagctcaaaacg			
601 L G A W G S L C N S H W D I E D A H V L			
1801 cttgtgcttggggtcctctgtactctcactgggacatagaagaatgccccatgttctt			
621 C Q Q L K C G V A L S T P G G A R F G K			
1861 tgccagcagcttaaatgtggagttgccctttctaccccaggaggagcagcttttggaaaa			
641 G N G Q I W R H M F H C T G T E Q H M G			
1921 ggaaatggtcagatctggaggcatatgtttcactgcactgggactgagcagcacatggga			
661 D C P V T A L G A S L C P S E Q V A S V			
1981 gattgtcctgtaactgctcagtgcttcattatgtccttcagagcaagtgccctctga			
681 I C S G N Q S Q T L S S C N S S S L G P			
2041 atctgtcaggaaaccagtcacaaacactgtcctcgtgcaattcatcgtcttggggcca			
701 T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R			

SEQÜÊNCIA		ID NO
2101	acaaggcctaccattccagaagaaagtgtgtggcctgcatagagagtgggtcaacttcgc	
721	L V N G G G R C A G R V E I Y H E G S W	
2161	ctggtaaattggaggaggtcgctgtgtgggagtagagatctatcatgagggtcctgg	
741	G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L	
2221	ggcaccatctgtgatgacagctgggacctgagtgatgcccacgtggtttgcagacagctg	
761	G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P	
2281	ggctgtggagaggccattaatgccactgggtctgtcattttggggaaggaacagggcc	
781	I W L D E M K C N G K E S R I W Q C H S	
2341	atctggctggatgagatgaaatgcaatggaaaagaatcccgcatttggcagtgccattca	
801	H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E	
2401	cacggctggggcagcaaaattgcaggcacaaggaggatgctgggagttatctgctcagaa	
821	F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E	
2461	ttcatgtctctgagactgaccagtgaagccagcagagaggcctgtgcaggggcgtctggaa	
841	V F Y N G A W G T V G K S S M S E T T V	
2521	gttttttacaatggagcttggggcactgttggcaagagtagcatgtctgaaaccactgtg	
861	G V V C R Q L G C A D K G K I N P A S L	
2581	ggtgtggtgtgcaggcagctgggtgtgcagacaaagggaaaatcaaccctgcatcttta	
881	D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D	
2641	gacaaggccatgtccattcccattgtgggtggacaatgttcagtgtccaaaggacctgac	
901	T L W Q C P S S P W E K R L A S P S E E	
2701	acgtgtgtggcagtgcccatcatctccatgggagaagagactggccagcccctcgaggag	
921	T W I T C D N K I R L Q E G P T S C S G	
2761	acctggatcacatgtgacaacaagataagacttcaggaaggaccacttctgttcttga	
941	R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L	
2821	cgtgtggagatctggcatggaggttctctgggggacagtgtgtgatgactcttgggacttg	
961	D D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K	
2881	gacgatgctcaggtgtgtgtcaacaacttggctgtgtgtccagctttgaaagcattcaaa	
981	E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G	
2941	gaagcagagtttgggtcaggggactggaccgatatggctcaatgaagtgaagtgcaaaggg	
1001	N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H	
3001	aatgagtccttcttgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt	
1021	K E D A A V N C T D I S V Q K T P Q K A	
3061	aaggaaagcgtgcagtgcaattgcacagatatattcagtgacagaaaacccacaaaaagcc	
1041	T T G R S S R Q S S F I A V G I L G V V	
3121	acaacagggtcgctcatcccgtcagtcattcttatttcagtcgggaccccttgggtgtgt	
1061	L L A I F V A L F F L T K K R R Q R Q R	
3181	ctgttgccattttctgcattattcttcttgcactaaaagcgaagacagagacagcgg	
1081	L A V S S R G E N L V H Q I Q Y R E M N	
3241	cttgcagtttctcctcaagagagagaacttagtcaccaaattcaataccgggagatgaat	
1101	S C L N A D D L D L M N S S G G H S E P	
3301	tcttgctgaatgcagatgatctggacctaattgaattcctcaggaggccattctgagcca	
1121	H	
3361	cac	
1	MSKLRMVLLE DSGSADFRRH FVNLSPTIT VVLLLSACFV TSSLGGTDKE	SEQ ID NO: 19
51	LRLVDGENKC SGRVEVKVQE EWGTVCCNGW SMEAVSVICN QLGCPATAIKA	
101	PGWANSSAGS GRIWMDHVSC RGNESALWDC KHDGKGKHSN CTHQQDAGVT	
151	CSDGSNLEMR LTRGNMCSG RIEIKFQGRW GTVCCDNFNI DHASVICRQL	
201	ECGSAVSFSG SSNFGEGSGP IWFDDLICNG NESALWNCKH QGWGKHNCBH	
251	AEDAGVICK GADLSRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDYA	
301	AVACKQLGCP TAVTAIGRVN ASKGFGHIWL DSVSCQGHPE AVWQCKHHEW	
351	GKHYNHND AGVTCSDGSD LELRLRGGGS RCGTVEVEI QRLGKVCDR	
401	GWGLKEADV CRQLGCGSAL KTSYQVYSKI QATNTWLFSL SCNGNETSLW	
451	DCKNWQWGL TCDHYEAKI TCSAHREPL VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG	
501	SICSDSFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFGEENGQI WAEFQCEGH	
551	ESHLSLCPVA PRPEGTCSHS RDVGVCSSRY TEIRLVNGKT PCEGRVELKT	
601	LGAWGSLCNS HWDIEDAHL CQQLKCGVAL STPGGARFGK GNGQIWRHMF	
651	HCTGTEQHMG DCPVTALGAS LCPSEQVASV ICSGNQSQT LSSCNSSSLGP	
701	TRPTIPEESA VACIESGQLR LVNGGRCAG RVEIYHEGSW GTICDDSWDL	
751	SDAHVVCRL CGGEAINATG SAHFGEGTGP IWLDEMCKNG KESRIWQCHS	
801	HGWGQQNCRH KEDAGVICSE FMSLRLTSEA SREACAGRLE VFYNGAWGTV	
851	GKSSMSETTV GVVCRLGCA DKGKINPASL DKAMSIPMWV DNVQCPKGP	
901	TLWQCPSSPW EKRLASPSEE TWITCDNKIR LQEGPTSCSG RVEIWHGGSW	
951	GTVCDDSWDL DDAQVVCQQL GCGPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCKG	
1001	NESSLWDCPA RRGHSECGH KEDAAVNCTD ISVQKTPQKA TTGRSSRQSS	
1051	PIAVGILGVV LLALFVALFF LTKRRQRQR LAVSSRGENL VHQIQYREMN	
1101	SCLNADDLDL MNSSGGHSEP H	

Exemplo 7: Clonagem e caracterização de CD163 murino

Com base na seqüência de CD163 murino no GenBank (AF274883), um iniciador para frente Mus-new5' (SEQ ID NO: 20) (5'-CACCGCGGCCCGCCACACGGAGCCATCAAATCATCAA-3') e um iniciador

para trás Mus-new3' (SEQ ID NO: 21) (5'-GGTACCGCGAACAAGCAAACCAATAGCAATATTGTTTAATTCCTC-3') foram planejados utilizando o programa PrimerSelect. Os sítios de endonucleases de restrição para *NotI* e *KpnI* foram incluídos nos iniciadores a 5' e a 3', respectivamente, para permitir a clonagem futura nos outros vetores de expressão. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram coletados de camundongos 2 dias após injetar o meio de tioglicolato na cavidade peritoneal. O RNA celular total foi preparado partindo de macrófagos peritoneais utilizando o kit RNeasy. As reações de RT-PCR e os parâmetros de RT-PCR eram os mesmos que os descritos no Exemplo 4, exceto pelo fato de que a temperatura de anelamento era aumentada até 60°C e a temperatura de extensão aumentada até 72°C. O produto da PCR foi purificado em um gel de agarose SeaKem a 0,8% e clonado de forma direcionada no pCDNA3.1D/V5/His/TOPO de acordo com as instruções do fabricante. Vários clones com grandes insertos foram identificados para a análise adicional. Um plasmídeo que contém um inserto (SEQ ID NO: 22) com um CD163 murino que codifica uma proteína do mesmo comprimento que (1121 aminoácidos SEQ ID NO: 24) e difere de Genbank AF274883 em apenas dois aminoácidos (99,8% de identidade) foi denominado de "pCDNA3.1D-murCD163v2".

Foi gerado um outro plasmídeo, "pCDNA3.1D-murCD163v3", que continha um inserto (SEQ ID NO: 25) que contém uma sequência codificadora de CD163 murino (SEQ ID NO: 26) que codifica uma proteína de 1159 aminoácidos de comprimento (SEQ ID NO: 27). Difere de AF274883 em apenas 3 aminoácidos dentro dos primeiros 1107 resíduos (99,7% de identidade), mas as sequências divergem completamente começando no resíduo 1108. Isto é devido a uma inserção de 82 nucleotídeos no cDNA e uma alteração concomitante no quadro de leitura a jusante da inserção. Como um resultado, o CD163v3 murino contém 52 aminoácidos em seu terminal carbóxi que não são homólogos aos 14 resíduos do terminal carbóxi do CD163v2 murino. Estas duas versões alternativas de CD163 murino "de comprimento completo" são mais provavelmente uma variação de proces-

samento do mesmo gene, como foi descrito para o CD163 humano (Law, S.K., Micklem, K.J., Shaw, J.M., Zhang, X.P., Dong, Y., Willis, A.C. e Mason, D.Y. (1993) A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. European Journal of Immunology 23 (9), 2320-2325).

SEQUÊNCIA						ID NO
gctttggaat	gggtggacac	agaatggttc	ttcttggagg	tgetggatct	cctggttgta	60
aaaggtttgt	ccatctaggt	ttctttgttg	tggctgtgag	ctcacttctc	agtgcctctg	120
ctgtcactaa	cgctcctgga	gaaatgaaga	aggaactgag	actggcgggt	ggtgaaaaca	180
actgtagtgg	gagagtggaa	cttaagatcc	atgacaagtg	gggcacagtg	tgcagtaacg	240
gctggagcat	gaatgaagtg	tccgtggttt	gccagcagct	gggatgcca	acttctatta	300
aagcccttgg	atgggctaac	tccagcgccg	gctctggata	tatctggatg	gacaaagttt	360
cttgtacagg	gaatgagtca	gctctttggg	actgcaaaca	tgatgggtgg	ggaaagcata	420
actgtacca	tgaaaaagat	gctggagtga	cctgtctaga	tggatcta	ttggagatga	480
gactggtgaa	cagtgcgggc	caccgatgct	taggaagagt	agaaataaag	ttccagggaa	540
agtgggggac	ggtgtgtgac	gacaacttca	gcaaagatca	cgcttctgtg	atttgtaaac	600
agcttgatg	tggaaagtgc	attagtttct	ctggctcagc	taaatgtgga	gctggttctg	660
gaccaatctg	gctcgatgac	ctggcatgca	atggaaatga	gtcagctctc	tgggactgca	720
aacaccgggg	atggggcaag	cataactgtg	accatgctga	ggatgtcggt	gtgatttgct	780
tagagggagc	agatctgagc	ctgagactag	tggatggagt	gtccagatgt	tcaggaagat	840
tggaaagtga	attccaagga	gaatggggga	ccgtgtgtga	tgataactgg	gatctccggg	900
atgcttctgt	ggtgtgcaag	caactgggat	gtccaactgc	catcagtgcc	attggtcgag	960
ttaatgccag	tgagggatct	ggacagattt	ggcttgacaa	catttcatgc	gaaggacatg	1020
aggcaactct	ttgggagtgt	aaacaccaag	agtggggaaa	gcattactgt	catcatagag	1080
aagacgctgg	cgtagacatg	tctgatggag	cagatctgga	acttagactt	gtaggtggag	1140
gcagtcgctg	tgtgtgcatt	gtggaggtgg	agattcagaa	gctgactggg	aagatgtgta	1200
gccgaggctg	gacactggca	gatgcggatg	tggtttgacg	acagcttggg	tgtggatctg	1260
cgcttcaaac	ccaggctaag	atctactcta	aaactggggc	aacaaatacg	tggctctttc	1320
ctggatcttg	taatggaaat	gaaactactt	tttggcaatg	caaaaactgg	cagtggggcg	1380
gcctttcttg	tgataatttc	gaagaagcca	aagttacctg	ctcaggccac	agggaaacca	1440
gactgggttg	aggagaaatc	ccatgctctg	gtcgtgtgga	agtgaacac	ggagacgtgt	1500
ggggctccgt	ctgtgatttt	gacttgtctc	tggaaagctg	cagtgtggtg	tgcagggaa	1560
tacaatgtgg	aacagtcgtc	tctatcctag	ggggagcaca	ttttggagaa	ggaagtggac	1620
agatctgggg	tgaagaattc	cagtgtagtg	gggatgagtc	ccatctttca	ctatgctcag	1680
tggcgccccc	gctagacaga	acttgtaccc	acagcagggg	tgtcagcgta	gtctgtctac	1740
gatacataga	tattcgtctg	gcaggcggcg	agtctctctg	tgagggaaga	gtggagctca	1800
agacactcgg	agcctggggg	ccoctctyca	gttctcattg	ggacatggaa	gatgctcatg	1860
tcttatgtca	gcagctgaag	tgtggggttg	cccaatctat	tccagaagga	gcacattttg	1920
ggaaaggagc	tggtcaggtc	tggagtcaca	tgttccactg	cactggaact	gaggaaacata	1980
taggagattg	cctcatgact	gctctgggtg	cgccgacgtg	ttccgaagga	caggtggcct	2040
ctgtcatctg	ctcaggaaac	caatcccaga	cactattgac	atgtagtcca	ttgtctccag	2100
ttccaaacaac	aagctctaca	attccaagg	agagtgaagt	tccctgcata	gcaagtggcc	2160
agcttcgctt	ggtaggtgga	ggtgtgcgct	cgctggaag	agtggaggtc	taccacgagg	2220
gctcttgggg	caccgtctgt	gatgacaatt	gggatatgac	tgatgccaat	gtggtgtgca	2280
agcagctgga	ctgtggcggt	gcaattaacg	ccactggctc	tgttacttcc	ggggaaggag	2340
caggagctat	ctggctagac	gaagtcattc	gcactgggaa	agagtctcat	atttggcagt	2400
gccattcaca	tggctgggga	cgccataact	gcaggcacia	agaagatgca	ggtgttatct	2460
gtcccgagtg	catgtctctg	aggctgacca	acgaagccca	caaagaaaac	tgcacaggtc	2520
gccttgaagt	gttttacaat	ggtacatggg	gcagtattgg	cagtagcaat	atgtctccaa	2580
ccactgtggg	ggtggtgtgc	cgctcagctg	gctgtgcaga	caacgggact	gtgaaaccca	2640
taccttcaga	caagacacca	tccaggccca	tgtgggtaga	tcgtgtgcag	tgtccaaaag	2700
gagttgacac	tttgtggcag	tggccctcgt	caccttggaa	acagagacag	gccagccct	2760
cctcccagga	gtcctggatc	atctgtgaca	acaaaataag	actccaggaa	gggcatacag	2820
actgttcttg	acgtgtggag	atctggcaca	aaggttcctg	gggaacagtg	tgtgatgact	2880
cctgggatct	taatgatgct	aaggttgtat	gtaagcagtt	gggctgtggc	caagctgtga	2940
aggcactaaa	agaagcagca	tttgttccag	gaactgggac	catatggctc	aatgaaatta	3000
agtgtagagg	gaatgagtct	tccctgtggg	attgtcctgc	caaaccgtgg	agtcacagcg	3060
actgtgggca	caaagaagat	gcttccatcc	agtgcctccc	aaaaatgact	tcagaatcac	3120
atcatggcac	aggtcacccc	accctcacgg	cactcttggt	ttgtggagcc	attctattgg	3180
tcctctcat	gtctctctc	ctgtggactc	tgaagcgacg	acagattcag	cgacttacag	3240
tttctcaag	aggagaggtc	ttgatacatc	aagttcagta	ccaagagatg	gattcaaagg	3300
cggatgatct	ggacttgctg	aaatcctcgg	gggtcattca	gaggcacact	gagaaggaaa	3360

SEQUÊNCIA						ID NO
atgataatatt ataatccact gaggttggag tttaagaagc cttgacagga cagccagcta						3420
aatggaacaa gagcccaggc aacgcacgga tgaccacagc tgcattctca tgcagtcctt						3480
tgtttcctgg aactctgctg aacctgcaaa aaccatattt gtgaatgtga ccacttaata						3540
gagatggggag actttt						3556
1 M G G H R M V L L G G A G S P G C K R F						SEQ ID
1 atgggtggacacagaatggttcttcttggaggtgctggatctcctggttgtaaaaggttt						NO:23 e
21 V H L G F F V V A V S S L L S A S A V T						24
61 gtccatctaggtttcttgttggctgtgagctcacttctcagtcgctctgctgtcact						
41 N A P G E M K K E L R L A G G E N N C S						
121 aacgctcctggagaaatgaagaaggaactgagactggcgggtggtgaaaacaactgtagt						
61 G R V E L K I H D K W G T V C S N G W S						
181 gggagagtggaaacttaagatccatgacaagtggggcacagtggtgcagtaacggctggagc						
81 M N E V S V V C Q Q L G C P T S I K A L						
241 atgaatgaagtgtccgtggtttgccagcagctgggatgcccaacttctattaaagccctt						
101 G W A N S S A G S G Y I W M D K V S C T						
301 ggatgggctaactccagcggcggctctggatatatctggatggacaaagtttctgtaca						
121 G N E S A L W D C K H D G W G K H N C T						
361 gggaatgagtcagctcttgggactgcaaacatgatgggtgggaaaagcataactgtacc						
141 H E K D A G V T C S D G S N L E M R L V						
421 catgaaaagatgctggagtgacctgctcagatggatctaatttggagatgagactggtg						
161 N S A G H R C L G R V E I K F Q G K W G						
481 aacagtcggggccaccgatgcttaggaagagtagaaataaagttccagggaagtggtggg						
181 T V C D D N F S K D H A S V I C K Q L G						
541 acggtgtgtgacgacaacttcagcaaatcagcgttctgtgatttgaacagcttggga						
201 C G S A I S F S G S A K L G A G S G P I						
601 tgtggaagtgccattagtttcttggctcagctaaattgggagctggttctggaccaatc						
221 W L D D L A C N G N E S A L W D C K H R						
661 tggctcagatgacctggcatgcaatggaaatgagtcagctcttgggactgcaaacaccgg						
241 G W G K H N C D H A E D V G V I C L E G						
721 ggatggggcaagcataactgtgacctgctgaggatgtcgggtgtgattttagagggga						
261 A D L S L R L V D G V S R C S G R L E V						
781 gcagatctgagcctgagactagtggatggagtgctccagatgttcagggaagattggaagtg						
281 R F Q G E W G T V C D D N W D L R D A S						
841 agattccaaggagaatgggggaccgtgtgtgatgataactgggatctccgggatgcttct						
301 V V C K Q L G C P T A I S A I G R V N A						
901 gtggtgtgcaagcaactgggatgtccaactgccatcagtgccattggtcgagttaatgcc						
321 S E G S G Q I W L D N I S C E G H E A T						
961 agtgagggatctggacagatttggcttgacaacatttcatgcaaggacatgaggcaact						
341 L W E C K H Q E W G K H Y C H H R E D A						
1021 ctttgggagtgtaaacaccaagagtggtgggaaagcattactgtcatcatagagaagacgct						
361 G V T C S D G A D L E L R L V G G G S R						
1081 ggcgtgacatgttctgatggagcagatctggaacttagacttgtaggtggaggcagtcgc						
381 C A G I V E V E I Q K L T G K M C S R G						
1141 tgtgctggcattgtggaggtggagattcagaagctgactgggaagatgtgtagccgaggc						
401 W T L A D A D V V C R Q L G C G S A L Q						
1201 tggacactggcagatgcggatgtggtttgcagacagcttggatgtggatctgcgcttcaa						
421 T Q A K I Y S K T G A T N T W L F P G S						
1261 accaggcataagatctactctaaaactggggcaacaaatcgtggctcttctcctggatct						
441 C N G N E T T F W Q C K N W Q W G G L S						
1321 tgtaattggaaatgaaactacttttggcaatgcaaaaactggcagtggtggcgcccttcc						
461 C D N F E E A K V T C S G H R E P R L V						
1381 tgtgataatttcgaagaagccaaagttaacctgtcagggccacaggggaacccagactggtt						
481 G G E I P C S G R V E V K H G D V W G S						
1441 ggaggagaaatcccatgctcgtgtggaagtgaacacggagacgtgtggtgggtctcc						
501 V C D D F D L S L E A A S V V C R E L Q C						
1501 gtctgtgattttgacttgtctctggaagctgccagtggtgtgtgctgaggaattacaatgt						
521 G T V V S I L G G A H F G E G S G Q I W						
1561 ggaacagtctgtctatccttagggggagcacattttggagaaggaagtggacagatctgg						
541 G E E F Q C S G D E S H L S L C S V A P						
1621 ggtgaagaattccagtgtagtggggatgagtcctccttctactatgctcagtggtggcccc						
561 P L D R T C T H S R D V S V V C S R Y I						
1681 ccgctagacagaacttgtaccacagcagggatgtcagcgtagtctgtctcacgatacata						
581 D I R L A G G E S S C E G R V E L K T L						
1741 gatattcgtctggcaggcggcgagtcctcctgtgaggggaagagtggagctcaagacactc						
601 G A W G P L C S S H W D M E D A H V L C						
1801 ggagcctgggggtccctctgtcagttctcattgggacatggaagatgctcatgtcttatgt						
621 Q Q L K C G V A Q S I P E G A H F G K G						
1861 cagcagctgaagtgtgggttgcctaatctattccagaaggagcacattttgggaaagga						
641 A G Q V W S H M F H C T G T E E H I G D						
1921 gctgttcagggtctggatgcacatgttccactgcactggaactgaggaacatataggagat						
661 C L M T A L G A P T C S E G Q V A S V I						
1981 tgccctcatgactgctctgggtgcgcgacgtgttccgaaggacaggtggcctctgtcatc						
681 C S G N Q S Q T L L P C S S L S P V Q T						
2041 tgctcaggaaaccaatccagacactattgccatgtagtgcattgtctccagtcctcaaca						
701 T S S T I P K E S E V P C I A S G Q L R						
2101 acaagctctacaattccaaaggagagtgaagttccctgcatagcaagtggccagcttcgc						
721 L V G G G G R C A G R V E V Y H E G S W						
2161 ttggtaggtggaggtgtgctgctgctggaagagtgagggtctaccacgagggctcttgg						
741 G T V C D D N W D M T D A N V V C K Q L						
2221 ggcaccgtctgtgatgacaattgggatatgactgatgccaatgtggtgtgcaagcagctg						
761 D C G V A I N A T G S A Y F G E G A G A						
2281 gactgtggcgtggcaattaacgccactggctctgcttacttcggggaaggagcaggagct						
781 I W L D E V I C T G K E S H I W O C H S						

SEQUÊNCIA						ID NO
2341	atctggctagacgaagtcattctgcactgggaaagagtctcatatttggcagtgccattca					
801	H G W G R H N C R H K E D A G V I C S E					
2401	catggctggggacgccataactgcaggcacaaagaagatgcaggtgttatctgtctcgag					
821	F M S L R L T N E A H K E N C T G R L E					
2461	ttcatgtctctgaggtgcaccaacgaagcccacaaagaaaactgcacaggtgccttgaa					
841	V F Y N G T W G S I G S S N M S P T T V					
2521	gtgttttacaatggtacatggggcagttattggcagtagcaatatgtctccaaccactgtg					
861	G V V C R Q L G C A D N G T V K P I P S					
2581	gggggtggtgtgcgcgtcagctgggctgtgacagacaacgggactgtgpaaccctacattca					
881	D K T P S R P M W V D R V Q C P K G V D					
2641	gacaagacaccatccaggcccatgtgggtagatcgtgtgcagtggtccaaaaggagttgac					
901	T L W Q C P S S P W K Q R Q A S P S S Q					
2701	acttttggcagtgcccctcgtcaccttggaaacagagacaggccagcccctcctccag					
921	E S W I I C D N K I R L Q E G H T D C S					
2761	gagtcctggatcatctgtgcacaacaaaataagactccagggaaggccatacagactgttct					
941	G R V E I W H K G S W G T V C D D S W D					
2821	ggacgtgtggagatctggcacaaaggttctctggggaacagtggtgtgactcctgggat					
961	L N D A K V C K Q L G C G Q A V K A L					
2881	cttaatgatgctaaggttgtatgtaagcagttgggctgtggccaagctgtgaaggcacta					
981	K E A A A F G P G T G P I W L N E I K C R					
2941	aaagaagcagcatttggtcagggaactgggcccatattggctcaatgaaattaagtgtaga					
1001	G N E S S L W D C P A K P W S H S D C G					
3001	gggaatgagttcttctgtgggattgtcctgccaaaccgtggagtcacagcgaactgtggg					
1021	H K E D A S I Q C L P K M T S E S H H G					
3061	cacaaagaagatgcttccactcagtgctctcccaaaaatgacttcagaatcacatcatggc					
1041	T G H P T L T A L L V C G A I L L V L L					
3121	acaggtcacccaccctcacggcactcttggtttgtggagccattctatttggctcctc					
1061	I V F L L W T L K R R Q I Q R L T V S S					
3181	attgtcttctcctgtggactctgaagcgacgacagattcagcgactacagtcttctca					
1081	R G E V L I H Q V Q Y Q E M D S K A D D					
3241	agaggagaggtcttgatacatcaagttcagtagcaagagatggattcaaaggcggatgat					
1101	L D L L K S S G V I Q R H T E K E N D N					
3301	ctggacttgctgaaatcctcgggggtcattcagaggcacactgagaaggaaaatgataat					
1121	L					
3361	tta					
1	MGGHRMVLG	GAGSPGCKRF	VHLGFFVAV	SSLLSASAVT	NAPGEMKKEL	SEQ ID NO: 24
51	RLAGGENNCS	GRVELKIHDK	WGTVCSNWS	MNEVSVCQ	LGCPTSIAL	
101	GWANSSAGS	YIWMKVST	GNESALWDCK	HDGWGKHNT	HEKDAGVCS	
151	DGSNLEMLRV	NSAGHRLGR	VEIKFQGWG	TVCDDNFSKD	HASVICKQLG	
201	CGSAISFSGS	AKLGAGSGPI	WLDDLACNGN	ESALWDCKHR	GWGKHNCDA	
251	EDVGVICLEG	ADLSRLVDG	VSRCSGRLEV	RFQGEWGTVC	DDNWDLRDAS	
301	VVCKQLGCPT	AISAIGRVNA	SESGQIWL	NISCEGHEAT	LWECKHQEWG	
351	KHYCHHREDA	GVTCSGDADL	ELRLVGGGSR	CAGIVEVEIQ	KLTKMCSRG	
401	WTLADADVVC	RQLGCGSALQ	TQAKIYKSTG	ATNTWLFPGS	CNGNETTFWQ	
451	CKNWQWGLS	CDNFEEAKVT	CSGHRPRLV	GGEIPCSGRV	EVKHGDVWGS	
501	VCDFDLSLEA	ASVVCRELQC	GTVVSILGGA	HFEGSGQIW	GEEFQCSGDE	
551	SHLSLCSVAP	PLDRTCTHSR	DVSVVCSRYI	DIRLAGGESS	CEGRVELKTL	
601	GAWGPLCSSH	WDMEDAHVLC	QQLKCGVAQS	IPEGAHFQKG	AGQVWSHMFH	
651	CTGTEEHIGD	CLMTALGAPT	CSEGQVASVI	CSGNQSQTL	PCSSLSPVQT	
701	TSSTIPKESE	VPCIASGQLR	LVGGGGRCAG	RVEVYHEGSW	GTVCDDNWD	
751	TDANVVCQL	DCGVAINATG	SAYFGEAGAG	IWLDEVICTG	KESHIWQCHS	
801	HGWGRHNCRH	KEDAGVICSE	FMSLRLTNEA	HKENCTGRLE	VFYNGTWGSI	
851	GSSNMSPTTV	GVVCRQLGCA	DNGTVKPIPS	DKTPSRPMWV	DRVQCPKQVD	
901	TLWQCPSSPW	KQRQASPSSQ	ESWIIICDNKI	RLQEGHTDCS	GRVEIWHKGS	
951	WGTVCDDSDW	LNDKAVVCKQ	LGCGQAVKAL	KEAAFPGPTG	PIWLNEIKCR	
1001	GNESSLWDCP	AKPWSHSDCG	HKEDASIQL	PKMTSESHHG	TGHPTLTALL	
1051	VCGAILLVLL	IVFLLWTLKR	RQIQLRTVSS	RGEVLIHQVQ	YQEMDSKADD	
1101	LDLLKSSGVI	QRHTEKENDN	L			
gctttggaat gggtggacac agaatggttc ttcttggagg tgctggatct cctggttgta 60						ID NO:25
aaaggtttgt ccatctaggt ttctttgttg tggctgtgag ctcacttctc agtgccctctg 120						
ctgtcactaa cgctcctgga gaaatgaaga aggaactgag actggcgggt ggtgaaaaca 180						
actgtagtgt gagagtggaa cttaagatcc atgacaagtg gggcacagtg tgcagtaacg 240						
gctggagcat gtaggaagtgt tccgtggttt gccagcagct gggatgccca acttctatta 300						
aagcccttgg atgggctaac tccagcgccg gctctggata tatctggatg gacaaagttt 360						
cttgtacagg gaatgagtc gctctttggg actgcaaaca tgatgggtgg ggaagcata 420						
actgtaccca tgaaaaagat gctggagtga cctgtctcaga tggatctaat ttggagatga 480						
gactggtgaa cagtgcgggc caccgatgct taggaagagt agaaataaag ttccaggga 540						
agtgggggac ggtgtgtgac gacaacttca gcaaagatca cgcttctgtg atttgtaaac 600						
agcttggatg ttggaagtgc attagtttct ctggctcagc taaattggga gctggttctg 660						
gaccaatctg gctcgatgac ctggcatgca atggaaatga gtcagctctc tgggactgca 720						
aacaccgggg atggggcaag cataactgtg accatgtctga ggatgtcggg gtgatttgc 780						
tagagggagc agatctgagc ctgagactag tggatggagt gtccagatgt tcaggaagat 840						
tggaagtga attccaagga gaatggggga ccgtgtgtga tgataactgg gatctccggg 900						
atgcttctgt ggtgtgcaag caactgggat gtccaaactgc catcagtgcc attggtcgag 960						

SEQUÊNCIA						ID NO		
ttaatgccag	tgaggggatct	ggacagattt	ggcttgacaa	catttcatgc	gaaggacatg	1020		
aggcaactct	ttgggagtgt	aaacaccaag	agtggggaaa	gcattactgt	catcatagag	1080		
aagacgctgg	cgtgacatgt	tctgatggag	cagatctgga	acttagactt	gtaggtggag	1140		
gcagtcgctg	tgctggcatt	gtggagggtg	agattccaga	gctgactggg	aagatgtgta	1200		
gccgaggctg	gacactggca	gatgcggagt	tggtttcgag	acagcttgga	tgtggatctg	1260		
cgcttcaaac	caaggtctaag	atctactcta	aaactggggc	aacaaatacg	tggctctttc	1320		
cttgtacttg	ttgtggaaat	gaaactactt	tttggcaatg	caaaaactcg	cagtggggcg	1380		
gcctttctct	tgataatttc	gaagaagcca	aagttacctg	ctcaggccac	agggaaacca	1440		
gactggttgg	aggagaaatc	ccatgctctg	gtcgtgtgga	aatgaaacac	ggagacgtgt	1500		
ggggctccgt	ctgtgatttt	gacttgtctc	tgggaagctgc	cagtgtgggtg	tgcagggaat	1560		
tacaatgtgg	aacagtcgct	tctatcctag	ggggagcaca	ttttggagaa	ggaagtggac	1620		
agatctgggg	tgaagaattc	cagtgtatgt	gggatgagtc	ccatctttca	ctatgctcag	1680		
tggcgcccc	cgtagacaga	acttgtacc	acacaggga	tgtcacgtga	gtctgctcac	1740		
gatacataga	tattcgtctg	gcaggcggtg	agtcctctg	tgagggga	gtggagctca	1800		
agacactcgg	agcctgggg	cccctctgca	gttctcattg	ggacatggaa	gatgctcatg	1860		
tcttatgtca	gcagctgaag	tgtgggggtg	cccaatctat	tcagaaggga	gcacattttg	1920		
ggaaaggagc	tggtcaggct	tggagtccaa	tgttccactg	cactgggaact	gaggaacata	1980		
taggagattg	cctcatgact	gctctgggtg	cgccgacgtg	ttccgaaggga	caggtggcct	2040		
ctgtctctg	ctcaggaaac	caatccaga	cactattgcc	atgtagtcca	ttgtctccag	2100		
tccaacaac	aagctctaca	attccaaagg	agagtgaagt	tcctctcata	gcaagtggcc	2160		
agcttcgctt	ggtaggtgga	ggtggctgct	gcgctggaag	agtggaggtc	taccacgagg	2220		
gctcttgggg	caccgtctgt	gatgacaatt	gggatatgac	tgatgccaat	gtggtgtgca	2280		
agcagctgga	ctgtggcggt	gcaattaacg	ccactggctc	tgcttacttc	gggggaaggag	2340		
caggagctat	ctggctagac	gaagtcact	gcaactggga	agagtctcat	atttggcagt	2400		
gccattcaca	tggctgggga	cgccataact	gcaggcacia	agaagatgca	ggtgttatct	2460		
gctccgagtt	catgtctctg	aggctgacca	acgaagccca	caagaaaaac	tcacaggtc	2520		
gccttgaagt	gttttacaat	ggtacatggg	gcagtattgg	cagttagcaat	atgtctccaa	2580		
ccactgtggg	ggtggtgtgc	cgctcagctg	gctgtgcaga	caacgggact	gtgaaacca	2640		
taccttcaga	caagacacca	tccaggccca	tgtgggtaga	tcgtgtgcag	tgtccaaaag	2700		
gagttgacac	tttgtggcag	tgccccctgt	caccttgga	acagagacag	gccagccct	2760		
cctcccagga	gtcctggatc	atctgtgaca	acaaaataag	actccaggaa	gggcatacag	2820		
actgttctgg	acgtgtggag	atctggcaca	aaggttctgt	gggaacagt	gtgtgatgact	2880		
cctgggatct	taatgatgct	aaggttgtat	gtaagcagtt	gggctgtggc	caagctgtga	2940		
aggcactaaa	agaagcagca	tttgggtccg	gaactgggcc	catatggctc	aatgaaatta	3000		
agtgtagagg	gaatgagttc	tcctgtggg	attgtcctgc	caaaccgtgg	agtcacagcg	3060		
actgtgggca	caaagaagat	gcttccatcc	agtgcctccc	caaaatgact	tcagaatcac	3120		
atcatggcac	aggtcacccc	accctcacgg	cactcttggt	ttgtggagcc	attctattgg	3180		
tcctctcat	tgttctctc	ctgtggactc	tgaagcgacg	acagattcag	cagctttacag	3240		
tttctcaag	aggagaggtc	ttgatacatc	aagttcagta	ccaagagatg	gattcaaagg	3300		
cggatgatct	ggacttgtct	aaatcctcgg	aaaattccaa	caattcatat	gattttaatg	3360		
atgatggact	gacatctttg	tctaataatc	ttcttatttc	tgaattaaa	aaggggtcat	3420		
tcagaggcac	actgagaagg	aaaatgataa	tttataatcc	actgaggttg	gagtttaaaga	3480		
agccttgaca	ggacagccgc	ctaaatggaa	caagagccca	ggcaacgcac	ggatgaccac	3540		
agctgcactc	tcatgcagtc	ctttgtttcc	tggaaactctg	ctgaacctgc	aaaaaccata	3600		
tttgtgaatg	tgaccactta	atagagatgg	gagactttt			3639		
1 M G G H R M V L L G G A G S P G C K R F						ID NO:26 e 27		
1	atgggtggacacagat	tgttcttctt	tggagggtg	ctggatctc	ctgtgtgtaa		agggttt	
21	V H L G C F A V V A V S S L S A S A V T							
61	gtccatctaggtttct	ttgttgggtg	gtgagctc	acttctcagt	gcctctgctgtc	act		
41	N A P G E M K K E L R L A A G G E N N C S							
121	aacgtcctggagaaat	gaagaagta	gactgagact	ggcggtg	gggtgaaac	naact		
61	G R V E L K I H D K W G T V C S N G W S							
181	gggagagtggaaact	taagatgcat	gacaagtg	ggggcacagt	gtgcagta	aacggctggagc		
81	M N E V S V V V C Q Q L G C P T S I K A L							
241	atgaatgaagtgtc	cggtgtt	ggcagcagct	gggatg	cccaactt	ctattaaagccctt		
101	G W A N S S A G S G Y I W M D K V S C T							
301	ggatgggctaact	ccagcgccgg	ctgtgata	tatctggat	ggcaaggtt	cttctgtaca		
121	G N E S A L W D C K H D G W G K H N C T							
361	gggaatgagtcagct	ctttgggact	gcaaacat	gatgggt	ggggaaagc	ataactgtacc		
141	H E K D A G V T C S D G S N L E M R L V							
421	catgaaaaagatg	ctggagtg	acctgctc	agatggat	ctaat	ttggagatgagactggtg		
161	N S A G H R C L G R V E I K F Q G K W G							
481	aacagtgcgggcc	caccgact	gcttag	gaagagt	tagaataa	aggttccagggaaagtggggg		
181	T V C D D N F S K D H A S V I C K Q L G							
541	acggtgtgtgac	gacaaact	tcagca	aaagat	cacgctt	ctgtgattgt	taaacagctgtgga	
201	C G S A I S F S G S A K L G A G S G P I							
601	tgtggaagtgcc	attagttt	ctctggct	cagctaa	attgggag	ctggttctg	ggaccaatc	
221	W L D D L A C N G N E S A L W D C K H R							
661	tggtc	gatgac	ctggcat	gcaatg	agtcag	ctctctg	gggactg	gcaaacaccgg
241	G W G K H N C D H A E D V G V I C L E G							
721	ggatggggca	agcataact	gtgaccat	gtgagat	gtcggtg	gtattgt	cttagagga	
261	A D L S L R L V D G V S R C S G R L E V							

SEQUÊNCIA	ID NO
781 gcagatctgagcctgagactagtggatggagtgtccagatgttcaggaagattggaagtg 281 R F Q G E W G T V C D D N W D L R D A S 841 agattccaaggagaatgggggacgtgtgtgatgataactgggatctccgggatgcttct 301 V V C K Q L G C P T A I S A I G R V N A 901 gtggtgtgcaagcaactgggatgtccaactgccatcagtgccattgggtcgagttaatgcc 321 S E G S G Q I W L D N I S C E G H E A T 961 agtgagggatctggacagatttggcttgacaacatttcatgccaaggacatgaggcaact 341 L W E C K H Q E W G K H Y C H H R E D A 1021 ctttgggagtgtaaacaccaagagtggggaagcattactgtcatcatagagaagacgct 361 G V T C S D G A D L E L R L V G G G S R 1081 ggctgtgacatgttctgatggagcagatctggaacttagactttaggtggaggcagtcgc 381 C A G I V E V E I Q K L T G K M C S R G 1141 tgtgctggcatttggaggtggagattcagaagctgactgggaagatgtgtagccgagggc 401 W T L A D A D V V C R Q L G C G S A L Q 1201 tggacactggcagatgcggatgtggtttgcagacagcttggatgtggatctgccttcaa 421 T Q A K I Y S K T G A T N T W L F P G S 1261 acccaggctaagatctactctaaaactggggcaacaaatagctggctcttctcctggatct 441 C N G N E T T F W Q C K N W Q W G G L S 1321 tgtaatggaaatgaaactacttttggcaatgcaaaaactggcagtgggggcgctttcc 461 C D N F E E A K V T C S G H R E P R L V 1381 tgtgataatttcgaagaagccaaagttacctgctcaggccacagggaacccagactggtt 481 G G E I P C S G R V E M K H G D V W G S 1441 ggaggagaaatcccatgctctgctgctgtggaatgaaacacggagacgtgtggggctcc 501 V C D F D L S L E A A S V V C R E L Q C 1501 gtctgtgatatttacttctctggaagctgccagtggtgtgtgcagggaattacaatgt 521 G T V V S I L G G A H F G E G S G Q I W 1561 ggaacagtcgtctctatcttagggggagcacatttggagaaggaagtggacagatctgg 541 G E E F Q C S G D E S H L S L C S V A P 1621 ggtgaagaattccagtgtagtggggatgagtcctatcttactatgctcagtgggcgccc 561 P L D R T C T H S R D V S V V C S R Y I 1681 ccgctagacagaacttgtaccacagcagggatgtcagcgtagtctgctcacgatacata 581 D I R L A G G E S S C E G R V E L K T L 1741 gatattctctggcaggcgagtcctcctgtgaggggaagagtggagctcaagactc 601 G A W G P L C S S H W D M E D A H V L C 1801 ggagcctgggggtccctctgcagttctcattggggacatggaagatgctcatgtttatgt 621 Q Q L K C G V A Q S I P E G A H F G K G 1861 cagcagctgaagtgtggggttgcccaatctattccagaaggagcacatttgggaaagga 641 A G Q V W S H M F H C T G T E E H I G D 1921 gctgggtcaggtctggagtcacatgttccactgcactggaactgaggaacatataggagat 661 C L M T A L G A P T C S E G Q V A S V I 1981 tgctcatgactgctctgggtgcgcgcagctgttccgaaggacaggtggcctctgtcatc 681 C S G N Q S Q T L L P C S S L S P V Q T 2041 tgctcaggaaaccaatcccagacactattgccatgtagttcattgtctccagtcctcaaca 701 T S S T I P K E S E V P C I A S G Q L R 2101 acaagctctacaatttcaaaggagagtgagtttccctgcatagcaagtgccagcttgcg 721 L V G G G G R C A G R V E V Y H E G S W 2161 ttggtaggtggaggtggctgctgctggaagagtggaggtctaccacaggggctcttgg 741 G T V C D D N W D M T D A N V V C K Q L 2221 ggcaccgtctgtgatgacaattgggatatgactgatgccaatgtggtgtgcaagcagctg 761 D C G V A I N A T G S A Y F G E G A G A 2281 gactgtgctggtgcaattaacgccactggctctgcttacttcggggaaggagcagagct 781 I W L D E V I C T G K E S H I W Q C H S 2341 atctggctagacgaagtcactgtcactgggaaagagtctcatatttggcagtgccattca 801 H G W G R H N C R H K E D A G V I C S E 2401 catggctggggacgccataactgcaggcacaaagaagatgcaggtgttatctgtctccgag 821 F M S L R L T N E A H K E N C T G R L E 2461 ttcatgtctctgaggtgacccaacgaagcccacaaagaaaactgcacaggtcgcttgaa 841 V F Y N G T W G S I G S S N M S P T T V 2521 gtgttttacaatggtacatggggcagtttggcagtagcaatatgtctccaaccactgtg 861 G V V C R Q L G C A D N G T V K P I P S 2581 ggggtggtgtgccgtcagctgggctgtgcagacaacgggactgtgaaaccataccttca 881 D K T P S R P M W V D R V Q C P K G V D 2641 gacaagacaccatccaggcccatgtgggtagatcgtgtgcagtgctcaaaaggagttgac 901 T L W Q C P S S P W K Q R Q A S P S S Q 2701 actttgtggcagtgccctcgtcaccttggaaacagagacagggccagccctctctccag 921 E S W I I C D N K I R L Q E G H T D C S 2761 gactcctggatcatctgtgacaacaaaataagactccaggaagggcatacagactgttct 941 G R V E I W H K G S W G T V C D D S W D 2821 ggacgtgtggagatctggcacaaaggttcttggggaacagtggtgtgactcctgggat 961 L N D A K V V C K Q L G C G Q A V K A L 2881 cttaatgatgtcaaggttggatgtaagcagttgggctgtggccaagctgtgaaggcacta 981 K E A A F G P G T G P I W L N E I K C R 2941 aaagaagcagcatttgggtccaggaactgggcccataatggctcaatgaaatgaagtgtaga 1001 G N E S S L W D C P A K P W S H S D C G 3001 gggaatgagttcttccctgtgggattgtcctgccaacccgtggagtcacagcagactgtggg 1021 H K E D A S I Q C L P K M T S E S H H G 3061 caaaagaagatgcttccatccagtgccctcccaaaatgacttcagaatcacatcatggc 1041 T G H P T L T A L L V C G A I L L V L L 3121 acaggtcacccaccctcaggccactcttgggttggagccattctattgggtcctcctc 1061 I V F L L W T L K R R Q I Q R L T V S S 3181 attgtcttctcctgtgactctgaagcgacgacagattcagcgacttacagtttctcctca 1081 R G E V L I H Q V Q Y Q E M D S K A D D 3241 agaggagaggtcttgatacatcaagttcagttaccaagagatggattcaaaggcggtgat 1101 L D L L K S S E N S N N S Y D F N D D G	

SEQUÊNCIA		ID NO
3301	ctggacttgcgtgaaatcctcggaattccaacaattcatatgattttaatgatgatgga	
1121	L T S L S K Y L P I S G I K K G S F R G	
3361	ctgacatctttgtctaaatatcttcctatttctggaattaaaaaggggtcattcagaggc	
1141	T L R R K M I I Y N P L R L E F K K P	
3421	acactgagaaggaaaatgataatttataatccactgaggttgaggtttaagaagcct	
1	MGGHRMVLLG GAGSPGCKRF VHLGFFVAV SLLLSASAVT NAPGEMKKEL	ID NO:27
51	RLAGGENNCS GRVELKIHDK WGTVCNWS MNEVSVVCQ LGCPTSICAL	
101	GWANSSAGSG YIWMKVST GNEALWDCK HDGWGKHNT HEKDAGVTCS	
151	DGSNLEMLRV NSAGHRCLGR VEIKFQKGW TVCDDNFSKD HASVICKQLG	
201	CGSAISFSGS AKLGAGSGPI WLDDLACNGN ESALWDCKHR GWGKHNDHA	
251	EDVGIVICLEG ADLSLRLVDG VSRCSGRLEV RFQGEWGTVC DDNWDLRDAS	
301	VVCKQLGCPT AISAIGRVNA SEGSGQIWL NISCEGHEAT LWECKHQEWG	
351	KHYCHHREDA GVTCSDGADL ELRLVGGGSR CAGIVEVEIQ KLTGKMCSRG	
401	WTLADADVVC RQLGCGSALQ TQAKIYSTG ATNTWLFPGS CNGNETTFWQ	
451	CKNWQWGLS CDFEAKVT CSGHREPLV GGEIPCSGRV EMKHGDVWGS	
501	VCDLDSLEA ASVVCRELQC GTVVSILGGA HFEGSGQIW GEEFQCSGDE	
551	SHLSLCSVAP PLDRCTHSR DVSVCVSYI DIRLAGGESS CEGRVELKTL	
601	GAWGFLCSSH WDMEDAHVLC QQLKCGVAQS IPEGAHFGKG AGQVWSHMFH	
651	CTGTEEHIGD CLMTALGAPT CSEGQVASVI CSQNSQTL PCSSLSPVQT	
701	TSSTIPKESE VPCIASGQLR LVGGGGRCAG RVEVYHEGSW GTVCDNNDM	
751	TDANVVKQL DCGVAINATG SAYFEGAGA IWLDEVICTG KESHIWQCHS	
801	HGWRHNRH KEDAGVICSE FMSLRLTNEA HKENCTGRLE VFYNGTWGSI	
851	GSSNMSPTTV GVVCRLGCA DNGTVKPIPS DKTPSRPMV DRVQCPKGV	
901	TLWQCPSSPW KQRQASPSQ ESWICDNKI RLQEGHTDCS GRVEIWHKGS	
951	WGTVCDDSD LNDKVVCKQ LGCGQAVKAL KEAAGFGGTG PIWLNEIKCR	
1001	GNESSLWDCP AKPWSHSDCG HKEDASIQL PKMTSESHHG TGHPTLTALL	
1051	VCGAILLVLL IVFLLWTLKR RQIQLTVSS RGEVLIHQVQ YQEMDSKADD	
1101	LDLLKSSENS NNSYDFNDG LTSLSKYLP SGIKKGSFRG TLRRKMIYN	
1151	PLRLEFKKP	

Exemplo 8: Clonagem e caracterização de MARC-145 CD163

Um iniciador para frente 5'simianCD163 (SEQ ID NO: 28) (5'-CACCGGAATGAGCAAACCTCAGAATGG-3' com base no CD163 humano) e um iniciador para trás HuCD163-3'Kpn (SEQ ID NO: 29) (5'-TGCTCCGGTACCTAGTCCAGGTCTTCATCAAGGTATCTTA-3') foram utilizados para amplificar o cDNA de CD163 de células de rim do Macaco Verde Africano MARC-145. O RNA celular total foi preparado partindo das células MARC-145 utilizando o kit RNeasy. Os parâmetros de RT-PCR eram como descrito no Exemplo 4. Os produtos de RT-PCR foram clonados de forma direcionada no vetor pCDNA3.1D/V5/His/TOPO de acordo com a instrução do fabricante. Foram analisados vários clones que contêm insertos grandes. O clone Nº 25 foi denominado de "pCDNA3.1D-MARC-CD163v2". Este novo cDNA de CD163 de células MARC-145 tem 1116 aminoácidos de comprimento. Quando comparada com as seqüências no banco de dados do GenBank, a seqüência de aminoácidos de CD163 de MARC-145 é 96,3% idêntica ao CD163 humano (Genbank Z22968), 84,7% idêntica ao CD163 de porco (Genbank AJ311716) e 73,9% idêntica ao CD163 de camundongo (Genbank AF274883).

SEQUÊNCIA						ID NO	
atgagcaaac	tcagaatggt	gctacttgaa	gactctggat	ctgctgacgt	cagaagacat	60	SEQ ID NO: 30
tttgtcaact	tgagtccctt	cactattgct	gtggctctac	ttctccgtgc	ctgttttgtc	120	
accagttctc	ttggaggaac	aaccaaggag	ctgaggctag	tgatgtgtga	aaacaagtgt	180	
agtgggagag	tggaaagtga	aatccaggag	gagtggggaa	cggtgtgtaa	taatggctgg	240	
agcatggaa	gactctctgt	gatttgtaac	cgctgggat	gtccaactgc	tatcaaagcc	300	
actggatggg	ctaattccag	tgcaggtct	ggacgcattt	ggaatgatca	tgtttcttgt	360	
cgtgggaatg	agtcagctct	ttgggactgc	aaacatgatg	gatggggaaa	gcatagtaac	420	
tgtactcacc	aacaagatgc	tggagtga	tgctcagatg	gatccgattt	ggaaatgagg	480	
ctgacgaatg	gagggaatat	gtgttctgga	agaatagaga	tcaaattcca	aggacagtgg	540	
ggaacagtg	gtgatgataa	cttcaacatc	aatcatgcat	ctgtgggttg	taaacaactt	600	
gaatgtggaa	gtgctgtcag	ttctcttggt	tcagctaat	ttggagaagg	ctctggacca	660	
atctgggttg	atgatcttat	tttcaacgga	aatgaatcag	ctctctggaa	ctgcaaaacat	720	
caaggatggg	gaaagcataa	ctgtgatcat	gctgaggatg	ctggagtgat	ttgctcaaag	780	
ggagcagatc	tgagcctgag	actggtagat	ggagtcactg	aatgttcagg	aagattagaa	840	
gtgagattcc	aaggagaatg	ggggacaata	tgtgatgacg	gctgggacag	tcatgatgct	900	
gctgtggcat	gcaagcaact	gggatgtcca	actgctatca	ccgccattgg	tcgagttaac	960	
gccagtggg	gatttggaca	catctggctt	gacagtgttt	cttgccaggg	acatgaacct	1020	
cggctctggc	aattgtaaca	ccatgaattg	ggaaagcatt	attgcaatca	caatgaagat	1080	
gctggcgtaa	catgttctga	tggatcagat	ctggagctaa	gacttagagg	tggaggcagc	1140	
cgctgtgctg	ggacagttga	ggtggagatt	cagagactgt	tagggaaggt	gtgtgacaga	1200	
ggctggggac	tgaagaagc	tgatgtggtt	tgagggcagc	tgggatgtgg	atctgcactc	1260	
aaaacatcct	atcaagtata	ctccaaaatc	caggcaacaa	acatgtggct	gtttctaagt	1320	
agctgtaacg	gaaatgaaac	ttctctttgg	gactgcaaga	actggcaatt	gggtggactt	1380	
acctgtgatc	actatgaaga	agccaaaatt	acctgctcag	ccacagagga	accacagctg	1440	
gttggaggag	acattccctg	ttctggacgc	gttgaagtga	agcatggtga	cacatggggc	1500	
tccgtctgtg	attcggattt	ctctctggaa	gctgccagcg	ttctatgcag	ggaattacag	1560	
tgtggcacag	tctctcttat	cctgggggga	gctcactttg	gagagggaaa	tggacagatc	1620	
tgggctgaag	aattccagtg	tgagggacat	gagtcccatc	tttactctg	cccagtagca	1680	
ccccgcccg	aaggaaactg	tagccacagc	agggatgttg	gagtagtctg	ctcaagatac	1740	
acagaaaattc	cttgggtgaa	tggcaagacc	ccatgtgagg	gcagagtgtg	ctcaaaacg	1800	
cttaatgcct	ggggatccct	ctgcaactct	cactgggaca	tagaagatgc	ccacgttctt	1860	
tgccaacaac	ttaaatgtgg	agttgccctt	tctaccccag	gaggagcaca	ttttggaaaa	1920	
ggaaatggtc	aggtctggag	gcatatgttt	cactgcactg	ggactgagca	gcacatggga	1980	
gattgtcctg	taactgctct	gggtgcttca	ctatgtcctt	cagggcaagt	ggcctctgta	2040	
atttgtctag	gaacaccatg	ccaaacactg	tcctcgtgca	attcatcatc	tctgggccc	2100	
acaaggcccta	ccattccaga	agaaagtgc	gtggcctgca	tagagatgtg	tcaactctgc	2160	
ttggtaaatg	gaggaggctg	ctgtgctggg	agagtagaga	tttatcatga	gggctcctgg	2220	
ggcaccatct	gtgatgacag	ctgggacctg	agcgatgccc	acgtgggtgt	cagacagctg	2280	
ggctgtggag	aggccattaa	tgccactggt	tctgctcatt	ttggagaagg	aacagggccc	2340	
atctggctgg	atgagatgaa	atgcaatgga	aaagaatccc	gcatttgcca	gtgccattca	2400	
catggctggg	ggcagcaaaa	ctgcaggcac	aaggaggatg	caggagtatt	ctgctcagag	2460	
ttcatgtctc	tgagatgtac	cagtgaagcc	agcagagagg	cctgtgacg	gggtctagaa	2520	
gttttttaca	acggagcttg	gggcagtgtt	ggcaggagta	acatgtctga	aaccactgtg	2580	
ggtgtggtgt	gcaggcagct	gggctgtgca	gacaaaggga	aatcaaccc	tgcatcttta	2640	
gacaaggcca	tgtccattcc	catgtgggtg	gacaatgttc	agtgtccaaa	aggacctgac	2700	
acgctgtggc	agtgcccatc	atctccatga	gagaagagac	tggccaggcc	ctcggaggag	2760	
acctggatca	catgtgacaa	caagatgaga	ctacaagaag	gaccacttc	ctgttctgga	2820	
cgtgtggaga	tctggcacgg	aggttctctg	gggacagtgt	gtgatgactc	ctgggacttg	2880	
aacgatgctc	agggtggtgt	tcaacaactt	ggctgtggtc	cagctttgaa	agcattcaaa	2940	
gaagcagagt	ttggtcaggg	gactggaccc	atatggctca	atgaagtga	gtgcaaaggg	3000	
aatgagtctt	ccttgtggga	ttgtcctgcc	agacgtctgg	gcacagtga	gtgtggacac	3060	
aaggaagagc	ctgcagtga	ttgcacagat	atttcaacga	acaaaacccc	acaaaaagcc	3120	
acaacaggct	agtcattcc	tattgcagtc	ggaatccttg	gagtgttct	cttggctcatt	3180	
ttcgtcgc	tattcttgat	tcaaaagcga	agacagagac	agcggtctac	agtttctcca	3240	
agaggagaga	acttagtcca	ccaaattcaa	taccggggaga	tgaattcttg	cctgaatgca	3300	
gatgatctgg	acctaataa	ttctcagga	ggccattctg	aggcacactg	aaaaggaaaa	3360	
tgggaattta	taaccagtg	agccttgaag	ataccttgat	gaagacctgg	acta	3414	
1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H							SEQ ID NO: 31 e 32
1 atgagcaaac tcagaatggt gctacttgaa gactctggat ctgctgacgt cagaagacat							
21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V							
61 ttgttcaacttgagtcctcttactattgtgtgtgttcttacttctccgtgctctgtttgtc							
41 T S S L G G C T T K E L R L V D G E N K C							
121 accagttctcttggaggaaacaaccaaggagctgaggctagtggatggtgaaacaagtgt							
61 S G R V E V K I Q E E W G T V T N N G W							
181 agtgggagagtggaaatgkaaacacaggagagtggtgggagagtggtgtgtaataatggctgg							
81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A							
241 agcattggaagcagctctctgtgatttgaataacagctgggatgtccaactgctatcaaagcc							
101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C							

SEQÜÊNCIA	ID NO
301 actggatgggctaattccagtgagggttctggacgacatttggatggatcatgtttctgt	
121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N	
361 cgtgggaatgagtcagctctttgggactgcaaacatgatggatgggaaagcatagtaac	
141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R	
421 tgtactcaccaacaagatgctggagtgacttgcagatggatccgatttggaaatgagg	
161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W	
481 ctgacgaatggaggaatatgtgttctggaagaatagagatcaaattccaaggacagtgg	
181 G T V C D D N F N I N H A S V V C K Q L	
541 ggaacagtgtgtgatgataaacttcaacatcaatcatctgtgttggtaaacactt	
201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P	
601 gaatgtggaagtgtgtcagtttctctgttgcagtaatttggagaaggctctggacca	
221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H	
661 atctgttggatgatcttatatgcaacggaaatgagtcagctctctggaactgcaaacat	
241 Q G W G K H N C D H A E D A G V I C S K	
721 caaggatgggaaagcataactgtgatcatgctgaggtgctggagtgatttgcataag	
261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E	
781 ggagcagatctgagcctgagactggttagatggagtcactgaatgttcaggaagattagaa	
281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S H D A	
841 gtgagattccaaggagaatgggggacaatatgtgatgacggctgggacagtcagtgct	
301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N	
901 gctgtgcatgcaagcaactgggatgtccaactgctatcaccgcatgtgtcgagtaac	
321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P	
961 gccagtgggatttggacacatctggcttgacagtgttcttgcaggggacatgaacct	
341 A V W Q C K H H E W G K H Y C N H N E D	
1021 gcggtctggcaatgtaaacacccatgaatgggaaagcattattgcaatcacaatgaagat	
361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G G S	
1081 gctggcgttaacatgttctgatggatcagatctggagctaagacttagaggtggagcagc	
381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R	
1141 cgctgtgctgggacagttgaggtggagattcagagactgttaggaaggtgtgtgacaga	
401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L	
1201 ggctgggactgaaagaagctgatgtgttgcaggcagctgggatgtggatctgcactc	
421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S	
1261 aaaacatcctatcaagtataactccaaatccaggcaacaacatgtggctgttcttaagt	
441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L	
1321 agctgtaacggaaatgaaacttctcttgggactgcaagaactggcaatggggtggactt	
461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L	
1381 acctgtgatcactatgaagaagccaaaattacctgctcagcccacagggaaaccagactg	
481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G	
1441 ttggaggagacattccctgttctggacgcttgaagtgaagcatggtgacacatggggc	
501 S V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q	
1501 tcggtctgtgattcggatttctcttggagctgccagcgttctatgcagggaattacag	
521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I	
1561 tgtggcacagtcgtctctatctctgggggagctcacttggagagggaatggacagatc	
541 W A E E F Q C E G H E S H L S L C P V A	
1621 tgggctgaagaattccagtgtagggacatgagtcctcttctactctgcccagtagca	
561 P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y	
1681 cccgcccagaaggaaactgtagccacagcaggatgttggagtagtctgctcaagatac	
581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T	
1741 acagaaattcgcttggatggaatggcaagaccccatgtgagggcagagtgagctcaaacg	
601 L N A W G S L C N S H W D I E D A H V L	
1801 cttaatgctgggatccctctgcaactctcactgggacatagaagatgccacgttctt	
621 C Q Q L K C G V A L S T P G G A H F G K	
1861 tgccaacaacttaaatgtggagttgcccttctaccccaggaggagcacatttggaaaa	
641 G N G Q V W R H M F H C T G T E Q H M G	
1921 ggaaatggtcaggtctggaggcatatgttctactgcactgggactgagcagcacatggga	
661 D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V	
1981 gattgtcctgttaactgctctgggtgcttactatgtcctcagggaagtgccctgtga	
681 I C S G N Q S Q T L S S C N S S S L G P	
2041 atttgcctaggaaaccagtcaccaactgtcctcgtgcaattcatcatctctgggccc	
701 T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R	
2101 acaaggcctaccattccagaagaaagtgtgtggcctgcatagagagtggtcaacttcgc	
721 L V N G G G R C A G R V E I Y H E G S W	
2161 ttggtaaatggaggaggtcgctgtgctgggagagtagagatttatcatgagggtctctg	
741 G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L	
2221 ggcaccatctgtgatgacagctgggacctgagcgtgcccacgtgtgtgcagacagctg	
761 G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P	
2281 ggctgtggagaggccattaatgccactggttctgctcatttggagaaggaaacaggggcc	
781 I W L D E M K C N G K E S R I W Q C H S	
2341 atctggctggatgagatgaaatgcaatggaaaagaatcccgcatgtggcagtgccattca	
801 H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E	
2401 catggctgggggacgaaaactgcaggcacaaggaggtgagcaggttatctgctcagag	
821 F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E	
2461 ttcatgtctctgagactgaccagtgagccagcagagagcctgtgcagggcgtctagaa	
841 V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V	
2521 gttttttacaacggagcttgggagctgttggcaggagtaacatgtctgaaaccactgtg	
861 G V V C R Q L G C A D K G K I N P A S L	
2581 ggtgtggtgtgcaggcagctgggtgtgcagacaagggaatcaaccctgcatcttta	
881 D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D	
2641 gacaaggccatgtccattcccatgtgggtggacaatgttcagtgctcaaaaggacctgac	
901 T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E	
2701 acgctgtggcagtgcccatcatctccatgggagaagagactggccaggccctcgaggag	
921 T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G	
2761 acctggatcacatgtgacaacaagatgagactacaagaaggaccacttctgttctgga	
941 R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L	

SEQÜÊNCIA		ID NO
2821	cgtgtggagatctggcaccggaggttctctgggggacagtggtgatgactcctgggacttg	
961	N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K	
2881	aacgatgctcaggtggtgtgtcaacaacttggtgtggtccagctttgaaagcattcaaa	
981	E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G	
2941	gaagcagagtttggtcaggggactggacccatatggctcaatgaagtgaagtgcaaaggg	
1001	N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H	
3001	aatgagtcttcttgtgggattgtcctgccagacgctggggccacagtgaagtgtggacac	
1021	K E D A A V N C T D I S T N K T P Q K A	
3061	aaggaagacgctgcagtggaattgcacagatatttcaacgaacaaaacccacaaaaagcc	
1041	T T G Q S S L I A V G I L G V V L L V I	
3121	acaacaggtcagtcaccccttattgcagtcggaatccttggagttgttctcttggctatt	
1061	F V A L F L T Q K R R Q R Q R L T V S S	
3181	ttcgtcgcatattcttctgactcaaaagcgaagacagagacagcggttacagtttctca	
1081	R G E N L V H Q I Q Y R E M N S C L N A	
3241	agaggagagaacttagtccaccaaattcaataccgggagatgaattcttgcctgaatgca	
1101	D D L D L M N S S G G H S E A H	
3301	gatgatctggacctaataatccctcaggaggccattctgaggcacac	
1	MSKLRMVLE DSGSADVRH FVNLSPFTIA VVLLLRACFV TSSLGGTTKE	SEQ ID NO: 32
51	LRLVDGENKC SGRVEVKIQE EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCPATAKA	
101	TGWANSSAGS GRIWMDHVSC RGNESALWDC KHDGWGKHSN CTHQQDAGVT	
151	CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQGGW GTVCCDDNFI NHASVVCKQL	
201	ECGSAVSFSG SANFGECSGP IWFDDLICNG NESALWNCKH QGWGKHNCBH	
251	AEDAGVICSK GADLSLRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDHA	
301	AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEGFGHIWL DSVSCQGHPE AVWQCKHHEW	
351	GKHYCNHNE AGVTCSDGSD LELRLRGGS RCAGTVEVEI QRLGKVCDR	
401	GWGLKEADV CRQLGCSAL KTSYQVYSKI QATNMWLFSL SCNGNETSLW	
451	DCKNWQWGL TCDHYEEAKI TCSAHREPR L VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG	
501	SVCDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFGEENGQI WAEFQCEGH	
551	ESHLSLCPVA PRPEGTCSHS RDVGVCVSRV TEIRLVNGKT PCEGRVELKT	
601	LNAGWSLNS HWDIEDAHL CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVWRHMF	
651	HCTGTEQHM DCPVTALGAS LCPGSGQVASV ICSGNQSQT L SSCNSSSLGP	
701	TRPTIPEESA VACIESGQLR LVNNGGRCAG RVEIYHEGSW GTICDDSDWL	
751	SDAHVVCRL GCGEAINATG SAHFGEGTGP IWLDEMCKNG KESRIWQCHS	
801	HGWQQNCRH KEDAGVICSE FMSLRLTSEA SREACAGRL VFYNGAWGSV	
851	GRSNMSETTV GVVCRLGCA DKGKINPASL DKAMSI PMWV DNVQCPKGP	
901	TLWQCPSSPW EKRLARPSEE TWITCDNKM LQEGPTSCSG RVEIWHGGSW	
951	GTVCDDSDWL NDAQVVCQL GCGPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCKG	
1001	NESSLWDCP RRWGHSECGH KEDAAVNCTD ISTNKTPQKA TTGQSSLIIV	
1051	GILGVLLVI FVALFLTQKR RQRRLTVSS RGENLVHQIQ YREMNSCLNA	
1101	DDLDLMNSSG GHSEAH	

Exemplo 9. Clonagem e caracterização de CD163 de símio de células células Vero.

Um iniciador para frente 5'simianCD163 (SEQ ID NO: 28) (5'-CACCGGAATGAGCAAACCTCAGAATGG-3' com base no CD163 humano) e um iniciador para trás HuCD163-3'Kpn (SEQ ID NO: 29) (5'-TGCTCCGGTACCTAGTCCAGGTCTTCATCAAGGTATCTTA-3') foram utilizados para amplificar o cDNA de CD163 de células Vero. O RNA celular total foi preparado partindo de células Vero utilizando o kit RNeasy. Os parâmetros de RT-PCR eram os mesmos que os descritos no Exemplo 4. Os produtos de RT-PCR foram clonados de forma direcionada no vetor pCDNA3.1D/V5/His/TOPO de acordo com a instrução do fabricante. Oito clones contendo grandes insertos foram seqüenciados e foram observados seis padrões de processamento distintos. Estes padrões são representados graficamente na Figura 17.

As seis variações de processamento diferem em relação à presença ou à ausência de três éxons, denominados de E6, E105 e E83. As omissões de E6 ou E105 não alteram o quadro de leitura, enquanto que a omissão de E83 altera. Os padrões similares a v2 e/ou a v3 também foram observados em células suínas, murinas, humanas e de macaco MARC-145. Os padrões v4 e v5 não possuem o éxon de 105 nucleotídeos que codifica a região transmembrana hidrofóbica. Estes cDNAs eram incapazes de tornar as células BHK permissivas à infecção pelo PRRSV em um ensaio de transfecção transitória, provavelmente porque o CD163 é secretado ao invés de ficar ligado à membrana. Embora as moléculas de CD163 que não possuem uma região transmembrana pareçam ser não funcionais como fatores de permissividade celular, é possível que possam ter utilidade na neutralização viral direta (similar aos anticorpos neutralizadores) ou como um imunógeno para a indução de anticorpos anti-CD163 que bloqueariam a infecção viral no animal hospedeiro.

A variação de processamento mais longa, v7, contém todos os três éxons E6, E105 e E83. Este novo cDNA de CD163 de células Vero codifica um polipeptídeo que tem 1153 aminoácidos de comprimento. Quando comparada às seqüências no banco de dados Genbank, a seqüência de aminoácidos CD163v7 de Vero é 95,4% idêntica ao CD163 humano (Genbank Z22968), 83,7% idêntica ao CD163 de porco (Genbank AJ311716) e 72,1% idêntica ao CD163 de camundongo (Genbank AF274883). O nucleotídeo e as seqüências de aminoácidos das seis variações de processamento encontradas nas células Vero são fornecidos abaixo (SEQ ID NOS: 33-44).

SEQÜÊNCIA		ID NO
1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H	1 ATGAGCAAACCTCAGAATGGTGCTACTTGAAGACTCTGGATCTGCTGACGTCAGAAGACAT	SEQ ID NO:33 e 34
21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V	21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V	
61 TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCCTGTTTGTGTC	61 TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCCTGTTTGTGTC	
41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C	41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C	
121 ACCAGTTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAACAAGTGT	121 ACCAGTTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAACAAGTGT	
61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W	61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W	
181 AGTGGGAGAGTGGAAGTGAATCCAGGAGGAGTGGGGAACGGTGTGTAATAATGGCTGG	181 AGTGGGAGAGTGGAAGTGAATCCAGGAGGAGTGGGGAACGGTGTGTAATAATGGCTGG	
81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A	81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A	
241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTTGTAACCAAGCTGGGATGTCCAAGTCTATCAAGCC	241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTTGTAACCAAGCTGGGATGTCCAAGTCTATCAAGCC	
101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C	101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C	
301 ACTGGATGGGCTAATPCCAGTGCAGGTTCTGGACGCATTTGGATGGATCATGTTTCTTGT	301 ACTGGATGGGCTAATPCCAGTGCAGGTTCTGGACGCATTTGGATGGATCATGTTTCTTGT	
121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N	121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N	
361 CGTGGGAATGAGTCAGCTCTTTGGGACTGCAACATGATGGATGGGGAAGCATAGTAAC	361 CGTGGGAATGAGTCAGCTCTTTGGGACTGCAACATGATGGATGGGGAAGCATAGTAAC	
141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R	141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R	
421 TGTACTCACCAACAAGATGCTGGAGTAAGTCTGCTCAGATGGATCCGATTTGGAAATGAGG	421 TGTACTCACCAACAAGATGCTGGAGTAAGTCTGCTCAGATGGATCCGATTTGGAAATGAGG	
161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W	161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W	
481 CTGACGAATGGAGGGAATATGTGTTCTGGAAGAATAGAGATCAAAATCCAAGGACATGG	481 CTGACGAATGGAGGGAATATGTGTTCTGGAAGAATAGAGATCAAAATCCAAGGACATGG	
181 G T V C D N F N I N H A S V V C K Q L	181 G T V C D N F N I N H A S V V C K Q L	
541 GGAACAGTGTGTGATGATAACTTCAACATCAATCATGCATCTGTGGTTGTAAACAACTT	541 GGAACAGTGTGTGATGATAACTTCAACATCAATCATGCATCTGTGGTTGTAAACAACTT	

SEQUÊNCIA	ID NO
201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P 601 GAATGTGGAAGTGTCTCAGTTTCTCTGGTTCAAGTAATTTGGAGAAGGCTCTGGACCA 221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H 661 ATCTGGTTTGATGATCTTATATGCAACGGAATGAGTCAGCTCTCTGGAAGTCAACAT 241 Q G W G K H N C D H A E D A G V I C S K 721 CAAGGATGGGGAAGCATAACTGTGATCATGCTGAGGATGCTGGAGTGATTGCTCAAAG 261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E 781 GGAGCAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGATGGAGTCACTGAATGTTGAGGAAGATTAGAA 281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S H D A 841 GTGAGATTCCAAGGAGAATGGGGACAATATGTGATGACGGCTGGGACAGTCATGATGCT 301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N 901 GCTGTGGCATGCAAGCAACTGGGATGTCCAAGTCTATCACCAGCATTTGGTCGAGTTAAC 321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P 961 GCCAGTGAGGGATTGGACACATCTGGCTTGACAGTGTCTTCTGCGAGGACATGAACCT 341 A V W Q C K H H E W G K H Y C N H N E D 1021 CGGGTCTGGCAATGTAAACACCATGAATGGGGAAGCATTATTGCAATCACAATGAAGAT 361 A G V T C S D G S G L E L R L R G G G S 1081 GCTGGCGTAACATGTTCTGATGGATCAGGTCTGGAGCTAAGACTTAGAGGTGGAGGCAGC 381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R 1141 CGCTGTGCTGGGACAGTTGAGGTGGAGATTGAGAGCTGTAGGGAGGTGTGTGACAGA 401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L 1201 GGCTGGGACTGAAAGAAGCTGATGTGTTTGCAGGCAGCTGGGATGTGGATCTGCACTC 421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S 1261 AAAACATCCTATCAAGTAACTCCAAAATCCAGGCAACAAACATGTGGCTGTCTTAAGT 441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L 1321 AGCTGTAACGGAAATGAAACTTCTCTTTGGGACTGCAAGAACTGGCAATGGGGTGGACTT 461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L 1381 ACCTGTGATCACTATGAAGAAGCCAAAATTACCTGCTCAGCCACAGGGAACCCAGACTG 481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G 1441 GTTGGAGGAGACATTCCCTGTCTGGACGCTTGAAGTGAAGCATGGTGACACATGGGGC 501 S V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q 1501 TCCGTCTGTGATTCGGATTCTCTCTGGAAGCTGCCAGCGTTCTATGCAGGGAATTACAG 521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I 1561 TGTGGCAGTCGTCTCTATCCTGGGGGAGCTCACTTTGGAGAGGGAATGGACAGATC 541 W T E E F Q C E G H E S H L S L C P V A 1621 TGGACTGAAGAATTCCAGTGTGAGGACATGAGTCCCATCTTTCACTCTGCCAGTAGCA 561 P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y 1681 CCCCAGGGAAGGAAGTGTAGCCACAGCAGGAGTGTGGAGTAGTCTGCTCAAGATAC 581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T 1741 ACAGAAATTCGCTTGGTGAATGGCAAGACCCCATGTGAGGGCAGAGTGGAGCTCAAAACG 601 L N A W G S L C N S H W D I E D A H V L 1801 CTTAATGCCTGGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCACGTTCTT 621 C Q Q L K C G V A L S T P G G A H F G K 1861 TGCCAACAATTAAATGTGGAGTTGCCCTTCTACCCAGGAGGAGCACATTTGGAAAA 641 G N G Q V W R H M F H C T G T E Q H M G 1921 GGAATGGTCAGGTCTGGAGGCATATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGCACATGGGA 661 D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V 1981 GATTGTCTGTAAGTCTCTGGGTGCTTCACTATGTCCTTCAAGGCAAGTGGCCTCTGTA 681 I C S G N Q S Q T L S S R N S S S L G P 2041 ATTTGCTCAGGAAACAGTCCCAACACTGTCTCGCGCAATTCATCATCTCTGGGCCCA 701 T R P T I P E S A V A C I E S G Q L R 2101 ACAAGGCCTACCATTCCAGAAGAAAGTGTGTGGCCTGCATAGAGAGTGGTCAACTTCGC 721 L V N G G G R C A G R V E I Y H E G S W 2161 TTGGTAAATGGAGAGGTGCTGTGCTGGGAGAGTAGAGATTATCATGAGGCTCTGGG 741 G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L 2221 GGCACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCCACGTGGTGTGCAGACAGCTG 761 G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P 2281 GGCTGTGGAGAGGCCATTAAATGCCACTGGTTCTGCTCATTTTGGAGAAGGAACAGGGCCC 781 I W L D E M K C N G K A E S R I W Q C H S 2341 ATCTGGCTGGATGAGATGAAATGCAATGGAAAAGAAATCCCGCATTTGGCAGTGCCATTCA 801 H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E 2401 CATGGCTGGGGGAGCAAACTGCAGGCACAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGCTCAGAG 821 F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E 2461 TTCATGTCTCTGAGACTGACCAGTGAAGCCAGCAGAGAGGCTGTGCAGGGCTCTAGAA 841 V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V 2521 GTTTTACAAACGAGCTTGGGGCAGTGTGGCAGGAGTAACATGTCTGAAACCATCTGTG 861 G V V C R Q L G C A D K G K I N S A S L 2581 GGTGTAGTGTGACGGCAGCTGGGCTGTGCAGACAAAGGGAAAATCAACTCTGCATCTTTA 881 D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D 2641 GACAAGGCCATGTCCATTCCCATGTGGGTGGACAATGTTCACTGTCCAAAAGGACCTGAC 901 T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E 2701 ACCTGTGGCAGTGGCCATCATCTCCATGGGAGAAGAGACTGGCCAGGCCCTCGGAGGAG 921 T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G 2761 ACCTGGATCAGATGTGACAACAAGATGAGACTACAAGAAGGACCCACTTCTGTCTCTGGA 941 R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L 2821 CGTGTGGAGATCTGGCAGGAGGTTCTGGGGGACAGTGTGTGATGACTCTGGGACTTG 961 N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K 2881 AACGATGCTCAGGTGTGTGTCACAACTTGGCTGTGGTCCAGCTTTGAAAGCATTCAAA 981 E A E F G Q G T G P I W L N E V K C E G 2941 GAAGCAGAGTTTGGTCAGGGGACTGGACCCATATGGCTCAATGAAGTGAAGTGCGAAGGG 1001 N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H 3001 AATGAGTCTTCTTGTGGGATTGTCTGCCAGACGCTGGGGCCACAGTGAGTGTGGACAC 1021 K E D A A V N C T D I S T R K T P Q K A 3061 AAGGAAGACGCTGCAGTGAATTGCACAGATATTCAACGCGCAAAACCCACAAAAGGCC	

SEQUÊNCIA		ID NO
1041 T T G Q S S L I A V G I L G V V L L A I		
3121 ACAACAGGTGAGTCATCCCTTATTGTCAGTCGGAATCCTTGGAGTTGTTCTCTTGGCCATT		
1061 F V A L F L T Q K R R Q R Q R L T V S S		
3181 TTCGTGCGATTATTCTTGACTCAAAGCGAAGACAGACAGCGGCTTACAGTTTCCTCA		
1081 R G E N L V H Q I Q Y R E M N S C L N A		
3241 AGAGGAGAGAACTTAGTCCACCAAAATCAATACCGGAGATGAATTCTTGCCTGAATGCA		
1101 D D L D L M N S S G G H S E A H		
3301 GATGATCTGGACCTAATGAATTCCTCAGGAGGCCATTCTGAGGCACAC		
1 MSKLRMVLE DSGSADVRH FVNLSPFTIA VLLLRACFV TSSLGGTTKE LRLVDGENKC	SEQ ID NO:34	
61 SGRVEVKIQE EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCPAIIKA TGWANSSAGS GRIWMDHVSC		
121 RGNESALWDC KHDGNGKHSN CTHQQDAGVT CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQGGW		
181 GTVCCDNFNI NHASVVCQL ECGSAVSFSG SANFGECSGP IWFDDLICNG NESALWNCKH		
241 QGWGKHNCNDH AEDAGVICSK GADLSLRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDHA		
301 AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEGFHGIWL DSVSCQGHPE AVWQCKHHEW GKHYCNHNE		
361 AGVTCSDGSG LELRLRGGS RCAGTVEVEI QRLLGKVCDR GWLKEADV CRQLGCGSAL		
421 KTSYQVYSKI QATNMWLFSL SCNGNETSLW DCKNWQWGL TCDHYEAKI TCSAHREPR		
481 VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG SVCDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFGEENGQI		
541 WTEEFQCEGH ESHLSLCPVA PRPEGTCSSHS RDVGVCSSRY TEIRLVNGKT PCEGRVELKT		
601 LNAWGSCLNS HWDIEDAHLV CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVWRHMF HCTGTQEHMG		
661 DCPVTALGAS LCPSGQVASV ICSGNQSQTLL SSRNSSSLGP TRPTIPEESA VACIESGQLR		
721 LVNNGGRCAG RVEIYHEGSW GTICDDSDWL SDAHVVCRQL GCGEAINATG SAHFGEETGP		
781 IWLDEMKNCG KESRIWQCHS HGWGQQNCRH KEDAGVICSE FMSLRLTSEA SREACAGRLE		
841 VFYNGAWGSV GRSNMSETTV GVVCRLGCA DKGKINSASL DKAMSIPMWV DNVQCPKGP		
901 TLWQCPSSPW EKRLARPEE TWITCDNMR LQEGPTSCSG RVEIWHGGSW GTVCDDSDWL		
961 NDAQVVCQL GCGPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCEG NESSLWDCA RRGHSECGH		
1021 KEDAAVNCTD ISTRKTPQKA TTGQSSLIIV GILGVLLAI FVALFLTQKR RQRRLTVSS		
1081 RGENLVHQIQ YREMNCLNA DDLDMNSSG GHSEAH		
1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H	SEQ ID NO:35 e 36	
1 ATGAGCAAATCAGAAATGGTGTCTTGAAGACTCTGGATCTGCTGACGTCAGAAGACAT		
21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V		
61 TTTGTCAACTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCCTGTTTTGTC		
41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C		
121 ACCAGTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAACAAGTGT		
61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W		
181 AGTGGGAGAGTGAAGTGAATAATCCAGGAGGAGTGGGGAACGGTGTGAATAATGGCTGG		
81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A		
241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTGTAAACAGCTGGGATGTCCAACTGCTATCAAGCC		
101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C		
301 ACTGGTGGGCTAATCCAGTGCAGGTTCTGGACGCATTGGATGGATCATGTTTCTGT		
121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N		
361 CGTGGGAATGAGTCACTCTTTGGGACTGCAACATGATGGATGGGGAAGCATAGTAAC		
141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R		
421 TGTACTACCAACAAGATGCTGGAGTAACCTGCTCAGATGGATCCGATTGGAAATGAGG		
161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W		
481 CTGACGAATGGAGGAATATGTTCTGGAAGAATAGAGATCAAAATCCAAGGACAGTGG		
181 G T V C D D N F N I N H A S V V C K Q L		
541 GGAACAGTGTGATGATAACTTCAACATCAATCATGCATCTGTGGTTTGTAAACAACTT		
201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P		
601 GAATGTGGAAGTGTCTGTCAGTTTCTGTTGCTCAGCTAATTTTGGAGAAGGCTCTGGACCA		
221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H		
661 ATCTGTTTGTATGATCTTATGCAACGGAATGAGTCAGCTCTCTGGAAGTCAACAT		
241 Q G W G K H N C D H A E D A G V I C S K		
721 CAAGGATGGGGAAGCATAACTGTGATCATGCTGAGGATGCTGGAGTGATTGCTCAAG		
261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E		
781 GGAGCAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGATGGAGTCACTGAATGTTGAGGAAGATTAGAA		
281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S H D A		
841 GTGAGATTCCAAGGAGAAATGGGGACAATATGTGATGACGGCTGGGACAGTCATGATGCT		
301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N		
901 GCTGTGGCATGCAAGCAACTGGGATGTCCAACTGCTATCACCGCCATTGGTCGAGTTAAC		
321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P		
961 GCCAGTGAGGATTGGACACATCTGGCTTGACAGTGTCTTGTGCCAGGGACATGAACCT		
341 A V W Q C K H H E W G K H Y C N H N E D		
1021 GCGGTCTGGCAATGTAAGCAACCATGAATGGGGAAGCATTATGCAATCACAATGAAGAT		
361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G G S		
1081 GCTGGCGTAACATGTTCTGATGGATCAGATCTGGAGCTAAGACTTAGAGGTGGAGGCGAG		
381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R		
1141 CGCTGTGCTGGGACAGTTGAGTgGAGATTGAGAGCTGTTAGGGAAGGTGTGTGACAGA		
401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L		
1201 GGCTGGGACTGAAAGAAGCTGATGTGGTTTGCAGGCAGCTGGGATGTGGATCTGCATC		
421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S		
1261 AAAACATCTATCAAGTATACTCCAAAATCCAGGCAACAAACATGTGGCTGTTTCTAAGT		
441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L		
1321 AGCTGTAAACGGAATGAACTTCTCTTTGGGACTGCAAGAACTGGCAATGGGGTGGACTT		
461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L		
1381 ACCTGTGATCACTATGAAGAAGCCAAAATTACCTGCTCAGCCACAGGGAACCCAGACTG		
481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G		
1441 GTTGGAGGAGACATTCCCTGTCTGGACGCGTTGAAGTGAAGCATGGTGACACATGGGGC		
501 S C D S D F S L E A A S V L C R E L Q		
1501 TCCGTCTGTGATTCCGATTCTCTCTGGAAGCTGCCAGCGTTCTATGCAGGAATTACAG		

SEQUÊNCIA		ID NO
521	C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I	
1561	TGTGGCAGTCGTCTCTATCTTGGGGGGAGCTCACTTTGGAGAGGGAAATGGACAGATC	
541	W T E E F Q C E G H E S H L S L C P V A	
1621	TGGACTGAAGAATTCAGTGTGAGGGACATGAGTCCCATCTTTCACTCTGCCAGTAGCA	
561	P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y	
1681	CCCCGCCAGAAAGAACTTGTAGCCACAGCAGGGATGTTGGAGTAGTCTGCTCAAGATAC	
581	T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T	
1741	ACAGAAATTCGCTTGGTGAATGGCAAGACCCCATGTGAGGGCAGAGTGGAGCTCAAAACG	
601	L N A W G S L C N S H W D I E D A H V L	
1801	CTTAATGCCTGGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCACGTTCTT	
621	C Q Q L K C G V A L S T P G G A H F G K	
1861	TGCCAACAACTTAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTACCCAGGAGGAGCACATTTTGGAAAA	
641	G N G Q V W R H M F H C T G T E Q H M G	
1921	GGAAATGGTCAGGTCTGGAGGCATATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGCACATGGGA	
661	D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V	
1981	GATTGTCCTGTAAGTGTCTGGGTGCTTCACTATGTCCTTCAGGGCAAGTGGCCTCTGTA	
681	I C S G N Q S Q T L S S C N S S S L G P	
2041	ATTTGCTCAGGAACACAGTCCCAACACATGTCCTCGTGAATTCATCATCTCTGGGCCCA	
701	T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R	
2101	ACAAGGCCTACCATTCAGAAAGAAAGTGTGTGGCCTGCATAGAGAGTGGTCAACTTCGC	
721	L V N G G R C A G R V E I Y H E G S W	
2161	TTGGTAAATGGAGGAGTGTGTGTGGGAGAGTAGAGATTTATCATGAGGGCTCCTGG	
741	G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L	
2221	GGCACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCCACGTGGTGTGACAGACAGTG	
761	G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P	
2281	GGCTGTGAGAGGCCATTAATGCCACTGGTTCGTCTCATTTTGGAGAAGGAACAGGGCCC	
781	I W L D E M K C N G K E S R I W Q C H S	
2341	ATCTGGCTGGATGAGATGAAATGCAATGGAAGAATCCCGCATTTGGCAGTGCCATTCA	
801	H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E	
2401	CATGGCTGGGGCAGCAAAACTGCAGGCACAAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGTCTCAGAG	
821	F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E	
2461	TTCATGTCTCTGAGACTGACCACTGAAGCCAGCAGAGAGGCCCTGTGCAGGGCGTCTAGAA	
841	V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V	
2521	GTTTTTTACAACGGAGCTTGGGGCAGTGTGGCAGGAGTAACATGTCTGAAACCACTGTG	
861	G V V C R Q L G C A D K G K I N S A S L	
2581	GGTGTAGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGCAGACAAAGGAAAAATCAACTCTGCATCTTTA	
881	D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D	
2641	GACAAGGCCATGTCCATTTCCCATGTGGGTGGACAATGTTTCACTGTCCAAAAGGACCTGAC	
901	T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E	
2701	ACGCTGTGGCAGTGGCCATCATCTCCATGGGAGAAGAGACTGGCCAGGCCCTCGGAGGAG	
921	T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G	
2761	ACCTGGATCACATGTGACAACAAGATGAGACTACAAGAAGGACCCACTTCCTGTCTCTGGA	
941	R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L	
2821	CGTGTGGAGATCTGGCAGCGAGGTTCTTGGGGGACAGTGTGTGATGACTCCTGGGACTTG	
961	N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K	
2881	AACGATGCTCAGTGGTGTGTCAACAACCTTGGCTGTGGTCCAGCTTTGAAAGCATTCAAA	
981	E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G	
2941	GAAGCAGAGTTTGGTCAGGGGACTGGACCCATATGGCTCAATGAAGTGAAGTGAAGGG	
1001	N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H	
3001	AATGAGTCTTCTTGTGGGATGTCTTCCAGACGCTGGGGCCACAGTGTGTGGACAC	
1021	K E D A A V N C T D I S T R K T P Q K A	
3061	AAGGAAGACGCTGCAGTGAATTGCACAGATATTTCAACGCGCAAAACCCACAAAAAGCC	
1041	T T G Q S S L I A V G I L G V V L L A I	
3121	ACAACAGTCAGTCATCCCTTATGTCAGTCGGAATCCTTGGAGTTGTTCTCTTGGCCATT	
1061	F V A L F L T Q K R R Q R Q R L T V S S	
3181	TTGTCGCATTATTTCTGACTCAAAAGCGAAGACAGAGACAGCGGCTTACAGTTTCTCTCA	
1081	R G E N L V H Q I Q Y R E M N S C L N A	
3241	AGAGGAGAGAAGTGTAGTCCACCAATTAATACCGGGAGATGAATTCTTGCCTGAATGCA	
1101	D D L D L M N S S E N S N E S A D F N A	
3301	GATGATCTGGACCTAATGAATTCCTCAGAAAATTCCAATGAGTCAGTGATTCAATGCT	
1121	A E L I S V S K F L P I S G M E K E A I	
3361	GCTGAACTAATTTCTGTGTCTAAATTTCTTCTTCTTCTGGAATGGAAGGAGGCCATT	
1141	L R H T E K E N G N L	
3421	CTGAGGCACACTGAAAAGGAAAATGGGAATTTA	
1	MSKLRMVLE DSGSADVRRH FVNLSFFTIA VVLLLRACFV TSSLGGTTKE LRLVDGENKC	SEQ ID NO:36
61	SGRVEVKIQE EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCPATAKA TGWANSSAGS GRIWMDHVSC	
121	RGNESALWDC KHDGWGKHSN CTHQQDAGVT CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQQGW	
181	GTWCDNDFNI NHASVVCKQL ECGSAVSFSG SANFEGSGP IWDDDLICNG NESALWNCKH	
241	QGWGKHNCBH AEDAGVICS KADLSRLRVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDHA	
301	AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEGFGHIWL DSVSCQGHPE AVWQCKHHEW GKHYCNHNED	
361	AGVTCSDGSD LELRLRGGS RCAGTVEVEI QRLLGKVC DR GWGLKEADV CRQLGCGSAL	
421	KTSYQVYSKI QATNMWLFSL SCNGNETSLW DCKNWQWGL TCDHYEEAKI TCSAHREPR	
481	VGGDIPSCGR VEVKHGDTWG SVCDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVVSILGG AHFGEQNGQI	
541	WTEEFQCEGH ESHLSLCPVA PRPEGTCSHS RDVGVCVSR Y TEIRLVNGKT PCGRVELKT	
601	LNAWGLSCNS HWDIEDAHVL CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVVRHMF HCTGTEQHM	
661	DCPVTALGAS LCPSGQVASV ICSGNQSQT L SSCNSSSLGP TRPTIPEESA VACIESGQLR	
721	LVNNGGRCAG RVEIYHEGSW GTICDDSWDL SDAHVVCRQL GCGEAINATG SAHFGEQGP	
781	IWLDEMKNCG KESRIWQCHS HGWGQONCRH KEDAGVICSE FMSRLTSEA SREACAGRL	
841	VFYNGAWGSV GRSNMSETTV GVVCRQLGCA DKGKINSASL DKAMSIPMWV DNVQCPKGP	
901	TLWQCPSSPW EKRLARPSEE TWITCDNKM LQEGFTSCSG RVEIWHGGSW GTVCDSDWL	

SEQUÊNCIA		ID NO
961	NDAQVVCQQL GCGPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCKG NESSLWDCPA RRWGHSECGH	
1021	KEDAAVNCTD ISTRKTPQKA TTGQSSLIIV GILGVLLAI FVALFLTQKR RQRQRLTVSS	
1081	RGENLVHQIQ YREMNSCLNA DDLDLMSSE NSNESADFNA AELISVSKFL PISGMEKEAI	
1141	LRHTEKENGN L	
	1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H	SEQ ID
	1 ATGAGCAAACTCAGAAATGGTGTCTACTTGAAGACTCTGGATCTGCTGACGTCAGAAACAT	NO: 37 e
	21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V	38
	61 TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCTGTTTGTGTC	
	41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C	
	121 ACCAGTTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAACCAAGTGT	
	61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W	
	181 AGTGGAGAGTGGAAAGTGAATAACCGAGGAGTGGGGAACGTGTGTAATAAGGCTGG	
	81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A	
	241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTTGTAACCAAGCTGGGATGCTCAACTGCTATCAAAGCC	
	101 T G W A N S A G S G R I W M D H V S C	
	301 ACTGGATGGGCTAATCCAGTCAGGTTCTGGACGCATTGGATGGATCATGTTTCTTGT	
	121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N	
	361 CGTGGGAATGAGTCAGCTCTTTGGGACTGCAACATGATGGGGAAGCATAGTAAC	
	141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R	
	421 TGTACTCACCAACAAGATGCTGGAGTAACCTGCTCAGATGGATCCGATTGGGAAATGAGG	
	161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W	
	481 CTGACGAATGGAGGGAATATGTGTTCTGGAAGAATAGAGATCAAATCCAAGGACAGTGG	
	181 G T V C D D N F N I N H A S V V C K Q L	
	541 GGAACAGTGTGTGATGATAACTTCAACATCAATCATGCATCTGTGGTTGTAAACAACCTT	
	201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P	
	601 GAATGTGGAAGTGTCTCAGTTTCTCTGGTTGAGCTAATTTGGGAAGGCTCTGGACCA	
	221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H	
	661 ATCTGGTTTGATGATCTTATATGCAACGGAATGAGTCAGCTCTCTGGAAGTCAACAT	
	241 Q G W G K H N C D H A E D A G V I C S K	
	721 CAAGGATGGGGAAGCATACTGTGATCATGCTGAGGATGCTGGAGTGATTGCTCAAG	
	261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E	
	781 GGAGCAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGATGGAGTCACTGAATGTTGAGGAAGATTAGAA	
	281 V R F Q G E W G T I C D D D G W D S H D A	
	841 GTGAGATTCCAAGGAGAATGGGGGACAATATGTGATGACGGCTGGGACAGTCATGATGCT	
	301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N	
	901 GCTGTGGCATGCAAGCAACTGGGATGTCCAACCTGCTATCACCGCCATTGGTGCAGTTAAC	
	321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P	
	961 GCCAGTGAAGGATTTGACACATCTGGCTTGACAGTGTTCCTGCCAGGGACATGAACCT	
	341 A V W Q C K H H E W G K H Y C C N H N E D	
	1021 GCGGTTGGCAATGTAAACACCATGAATGGGGAAGCATTATTGCAATCACAATGAAGAT	
	361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G G S	
	1081 GCTGGCGTAACATGTTCTGATGGATCAGATCTGGAGCTAAGACTTAGAGGTGGAGCAGC	
	381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R	
	1141 CGCTGTGCTGGGACAGTTGAGTGGAGATTGACAGACTGTTAGGGAAGGTGTGTGACAGA	
	401 G G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L	
	1201 GGCTGGGGACTGAAAGAAGCTGATGTGGTTTGACAGGAGCTGGGATGGGATGCGACTC	
	421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S	
	1261 AAAACATCCTATCAAGTATACTCCAAAATCCAGGCAACAAACATGTGGCTGTTCTAAGT	
	441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L	
	1321 AGCTGTAACGGAAATGAACTTCTCTTTGGGACTGCAAGAATGGCAATGGGGTGGACTT	
	461 T C D H Y E E A K I T C S H R E P R L	
	1381 ACCTGTGATCACTATGAAGAAGCCAAAATTACCTGCTCAGCCACAGGCAACCCAGACTG	
	481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G	
	1441 GTTGGAGGAGACATTCCTGTTCTGGACGCGTTGAAGTGAAGCATGGTGACACATGGGGC	
	501 S V C D S D S F S L E A A S V L C R E L Q	
	1501 TCCGCTGTGATTCCGATTCTCTCTGGAAGCTGCCAGCGTTCTATGCAGGGAATTACAG	
	521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I	
	1561 TGTGGCAGACTCGTCTTACTCTGGGGGAGCTCACTTTGGAGAGGAAATGGACAGATC	
	541 W T E E F Q C E G H E S H L S L C P V A	
	1621 TGGAGTGAAGAATCCAGTGTGAGGGACATGAGTCCCATCTTCACTGTGCCAGTAGCA	
	561 P R P E G T C S H S R D V G V C S R Y	
	1681 CCCCAGGAGGAAGGAACCTGTAGCCACAGCAGGGATGTTGGAGTAGTCTGCTCAAGATAC	
	581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T	
	1741 ACAGAAATTCGTTGGTGAATGGCAAGACCCATGTGAGGGCAGAGTGAGACTCAAAACG	
	601 L N A W G G S L C N S H W D I E D A H V L	
	1801 CTTAATGCCTGGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCACGTTCTT	
	621 C Q Q L K C G V A L S T P G A H F G K	
	1861 TGCCAAACACTTAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTACCCAGGAGGAGCACATTTTGGAAAA	
	641 G N G Q V W R H M F H C T G T E G Q H M G	
	1921 GGAAATGGTCAGGCTGGAGGCATATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGCACATGGGA	
	661 D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V	
	1981 GATTGTCCTGTAAGTCTCTGGGTGCTTCACTATGTCTCTCAGGGCAAGTGGCTCTGTA	
	681 I C S G N Q S Q T L S S C N S S L G P	
	2041 ATTTGCTCAGGAAACAGTCCCAACACTGTCTCGTGCAATTATCATCTCTGGGCCCCA	
	701 T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R	
	2101 ACAAGGCCTACCATTCCAGAAAGTAGTGTGGCCTGCATAGAGAGTGGTCAACTTCGC	
	721 L V N G G R C A G R V E I Y H E G S W	
	2161 TTGGTAAATGGAGGAGTCCGTGTGCTGGGAGAGTAGAGATTATCATGAGGGCTCCTGG	

SEQÜÊNCIA	ID NO
2341 ATCTGGCTGGATGAGATGAAATGCAATGGAAAAGAAATCCCGCATTTGGCAGTGCCATTCA 801 H G W G Q Q N N C R H K E D A G V I C S E 2401 CATGGCTGGGGGAGCAAACTGCAGGCACAAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGCTCAGAG 821 F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E 2461 TTCATGTCTCTGAGACTGACCACTGAAGCCAGCAGAGAGGCCTGTGCAGGGCGTCTAGAA 841 V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V 2521 GTTTTTCACACGAGCTTGGGGCAGTGTGGCAGGAGTAACATGTCTGAAACCACTGTG 861 G V V C R Q L G C A D K G K I N S A S L 2581 GGTGTAGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGCAGACAAAGGAAAAATCAACTCTGCATCTTTA 881 D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D 2641 GACAAGGCCATGTCCATTCCTATGTGGGTGGACAATGTTTCTGCTCCAAAAGGACCTGAC 901 T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E 2701 ACCTGTGGCAGTGGCCATCATCTCCATGGGAGAGAGACTGGCCAGGCCCTCGGAGGAG 921 T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G 2761 ACCTGGATCACATGTGACAACAAGATGAGACTACAAGAAGGACCCACTTCCTGTTCTGGA 941 R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L 2821 CGTGTGGAGATCTGGCAGCGAGGTTCCTGGGGGACAGTGTGTGATGACTCCTGGGACTTG 961 N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K 2881 AACGATGCTCAGGTGGTGTGTCAACAACCTTGGCTGTGGTCCAGCTTTGAAAGCATTCAA 981 E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G 2941 GAAGCAGAGTTTGGTCAAGGGGACTGGACCCATATGGCTCAATGAAGTGAAGTGCAAAAGG 1001 N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H 3001 AATGAGCTCTCTTGTGGGATGTCTGCCAGACGCTGGGGCCACAGTGAGTGTGGACAC 1021 K E D A A V N C T D I S T R K T P Q K A 3061 AAGGAAGACGCTGCGGTGAATTGCACAGATATTTCAACGCGCAAAACCCACAAAAAGCC 1041 T T V S S R G E N L V H Q I Q Y R E M N 3121 ACAACGGTTTCTCAAGAGGAGAGAACTTAGTCCACCAATTAATACCGGGAGATGAAT 1061 S C L N A D D L N L M N S S G G H S E A 3181 TCTTGCCTGAATGCAGATGATCTGAACCTAATGAATTCTCAGGAGGCCATTCTGAGGCA 1081 H * K G K E F I T Q 3241 CACTGAAAAGGAAAATGGGAATTTATAACCCAG	
1 MSKLRMVLLE DSGSADVRH FVNLSPFTIA VVLLLRACFV TSSLGGTTKE LRLVDGENKC 61 SGRVEVKIQC EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCPTAIKA TGWANSSAGS GRIWMDHVSC 121 RGNESALWDC KHDGWGKHSN CTHQQDAGVT CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQGW 181 GTVCCDNFNI NHASVVCQQL ECGSAVSFSG SANFGECSGP IWFDDLICNG NESALWNCKH 241 QGWGKHNCNDH AEDAGVICS KADLSLRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDHA 301 AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEFGHIWL DSVSCQHEP AVWQCKHHEW GKHYCNHNED 361 AGVTCSDGSD LELRLRGGGS RCAGTVEVEI QRLGLKVCDR GWGLKEADV CRQLGCGSAL 421 KTSYQVYSKI QATNMWLFSL SCNGNETSLW DCKNWQWGL TCDHYEEAKI TCSAHREPR 481 VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG SVCDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFEGNGQI 541 WTEEFQCEGH ESHLSLCPVA PRPEGTCSHS RDVGVCVCSRY TEIRLVNGKT PCEGRVELKT 601 LNAWGLCNS HWDIEDAHL CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVWRHMF HCTGTQEHMG 661 DCPVTALGAS LCPGQVASV ICSGNQSQTL SSCNSSSLGP TRPTIPEESA VACIESGQLR 721 LVNGGGRCAG RVEIYHEGSW GTICDDSWDL SDAHVVCRQL CGGEAINATG SAHFGEGTGP 781 IWLDEMCKNG KESRIWQCHS HGWGQONCRH KEDAGVICSE FMSLRILTSEA SREACAGRLE 841 VFYNGAWGSV GRSNMSETTV GVVCRLGCA DKGKINSASL DKAMSIPMWV DNVCPKPGPD 901 TLWQCPSSPW EKRLARPSEE TWITCDNKM LQEGPTSCSG RVEIWHGGSW GTVCCDSWDL 961 NDAQVVCQQL GCGPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCKG NESSLWDCA RRGHSECGH 1021 KEDAAVNCTD ISTRKTPQKA TTVSSRGENL VHQIYREMN SCLNADDLNL MNSSGGHSEA 1081 H	SEQ ID NO:38
1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H 21 ATAGACAACTCaGAATGGTGTCTACTTGAAGACTCTGGATCTGCTGACCTCAGAAGACAT 61 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V 121 TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCCTGTTTGTG 41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C 181 ACCAGTTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAAACAAGTGT 61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W 181 AGTGGGAGAGTGGAAAGTGAATACTCCAGGAGGAGTGGGGAACGGTGTGTAATAATGGCTGG 81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A 241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTTGTAACCAAGCTGGGATGTCCAACGTCTATCAAAGCC 101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C 301 ACTGGATGGGCTAATTCAGTGCAGGTCTGGACGCATTGGATGGATCATGTTTCTTGT 121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N 361 CGTGGGAATGAGTCAGCTCTTGGGACTGCAACATGATGGATGGGGAAGCATAGTAAC 141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R 421 TGTACTCACCACAAGATGCTGGAGTGAAGTCTGCTCAGATGGATCCGATTGGAAATGAGG 161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W 481 CTGACGAATGGAGGGAATATGTGTTCTGGAAGAATAGAGATCAAATTCGAAGGACAGTGG 181 G T V C D D N F N V N H A S V V C K Q L 541 GGAACAGTGTGTGATAACTTCAACGTCATCATGCTGTGGTTTGTAAACAACCTT 201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P 601 GAATGTGGAAGTGTCTGAGTTTCTGCTGCTAGCTAATTTTGGAGAAGGCTCTGGACCA 221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H 661 ATCTGGTTTGTATGATCTTATATGCAACGGAATGAGTCAAGTCTCTGGAAGTCAAAACAT 241 Q G W G K H C D H A E D A G V I C S K 721 CAAGGATGGGGAAGCATAACTGTGATCATGCTGAGGATGCTGGAGTGTGCTCAAAG 261 G A D L S L R L V D G G V T E C S G R L E 781 GGAGCAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGTGGAGTCACTGAATGTTCAGGAAGATTAGAA 281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S H D A	SEQ ID NO:39 and 40

SEQÜÊNCIA	ID NO
841 GTGAGATTCCAAGGAGAATGGGGGACAATATGTGATGACGGCTGGGACAGTCATGATGCT 301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N 901 GCTGTGGCATGCAAGCAACTGGGATGTCCAAGTCTATCACCGCATTGGTCGAGTTAAC 321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P 961 GCCAGTGAGGGATTGGACACATCTGGCTTGACAGTGTCTTGGCCAGGGACATGAACCT 341 A V W Q C K H H E W G K H Y C N H N E D 1021 GCGTCTGGCAATGTAACACCATGAATGGGAAAGCATTATTGCAATCACAATGAAGat 361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G G S 1081 GCTGGCGTAACATGTTCTGATGGATCAGATCTGGAGCTAAGACTTAGAGGTGGAGGCAGC 381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R 1141 CGCTGTGCTGGGACAGTTGAGGTGGAGATtCAGAGACTGTTAGGGAAGGTGTGTGACAGA 401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L 1201 GGCTGGGGACTGAAAGAAGCTGATGTGGTTTGCAGGCAGCTGGGATGTGGATCTGCACTC 421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S 1261 AAAACATCCTATCAAGTATACTCCAAAATCCAGGCAACAAACATGTGGCTGTTTCTAAGT 441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L 1321 AGCTGTAACGGAATGAACTTCTCTTTGGGACTGCAAGAACTGGCAATGGGGTGGACTT 461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L 1381 ACCTGTGATCACTATGAAGAAGCCAAAATTACCTGCTCAGCCCACAGGGAACCCAGACTG 481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G 1441 GTTGGAGGAGACATTCCTGTTCTGGACGCGTTGAAGTGAAGCATGGTGACACATGGGGC 501 S V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q 1501 TCCGTCTGTGATTCCGATTCTCTCTGGAAGCTGCCAGCGTTCTATGCAGGGAATTACAG 521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I 1561 TGTGGCACAGTCGTCTCTATCTCTGGGGGAGCTCACTTTGGAGAGGGAATGGACAGATC 541 W A E E F Q C E G H E S H L S L C P V A 1621 TGGGCTGAAGAATTCAGTGTGAGGACATGAGTCCCATCTTCACTCTGCCAGTAGCA 561 P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y 1681 CCCC GCCAGAAGGAACCTGTAGCCACAGCAGGGATGTTGGAGTAGTCTGCTCAAGATAC 581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T 1741 ACAGAAATTCGCTTGGTGAATGGCAAGACCCCATGTGAGGCGAGTGGAGCTCAAACG 601 L N A W G S L C N S H W D I E D A H V L 1801 CTTAATGCTGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCACGTTCTT 621 C Q Q L K C G V A L S T P G G A H F G K 1861 TGCCAACAACCTAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTACCCAGGAGGAGCACATTTTGGAAAA 641 G N G Q V W R H M F H C T G T E Q H M G 1921 GGAAATGTGTCAGGTCTGGAGGCATATGTTTCACTGCAGTGGGACTGAGCAGCACATGGGA 661 D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V 1981 GATTGTCTGTAACCTGCTGGGTGCTTCACTATGTCCTTCAGGCAAGTGGCCCTGTGA 681 I C S G N Q S Q T L S S C N S S S L G P 2041 ATTTGCTCAGGAAACAGTCCCAACACTGTCTCGTGAATTCATCATCTCTGGGCCCCA 701 T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R 2101 ACAAGGCCTACCATTCAGAAGAAAGTGCTGTGGCTGCATAGAGAGTGGTCAACTTCGC 721 L V N G G G R C A G R V E I Y H E G S W 2161 TTGGTAAATGGAGAGGTGCTGTGCTGGGAGAGTAGAGATTTATCATGAGGGCTCTGG 741 G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L 2221 GGCACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCCACGTTGGTGTGCAGACAGCTG 761 G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P 2281 GGCTGTGGAGAGGCCATTAATGCCACTGGTTCTGTCTATTTGGAGAAGGAACAGGGCCC 781 I W L D E M K C N G K E S R I W Q C H S 2341 ATCTGGCTGGATGAGATGAAATGCAATGAAAAGAAATCCCGTATTGGCAGTGCCATTCA 801 H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E 2401 CATGGCTGGGGGACAGCAAACTGCAGGCACAAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGCTCAGAG 821 F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E 2461 TTCTGTCTCTGAGACTGACCACTGAAGCCAGCAGAGAGCCTGTGCAGGGCGTCTAGAA 841 V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V 2521 GTTTTTCACACGGAGCTTGGGGCAGTGTGGCAGGAGTAACATGTCTGAAACCATGTG 861 G V V C R Q L G C A D K G K I N S A S L 2581 GGTGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGCAGACAAAGGGAAAATCAACTCTGCATCTTTA 881 D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D 2641 GACAAGGCCATGTCCATTCCCATGTGGGTGGACAATGTTCAAGTGTCCAAAAGGACCTGAC 901 T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E 2701 ACGTGTGGCAGTGCCCATCATCTCCATGGGAGAGAGACTGGCCAGGCCCTCGGAGGAG 921 T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G 2761 ACCTGGATCACATGTGACAACAAGATGAGACTACAAGAAGGACCCACTTCTGTCTGGA 941 R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L 2821 CGTGTGGAGATCTGGCACGAGGTTCTGGGGGACAGTGTGTGATGACTCTGGGACTTG 961 N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K 2881 AACGATGCTCAGGTGGTGTGTCAACAACCTGGCTGTGGTCCAGCTTTGAAAGCATTCAAA 981 E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G 2941 GAAGCAGAGTTTGGTCAGGGGACTGGACCCATATGGCTCAATGAAGTGAAGTGCAAAGGG 1001 N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H 3001 AATGAGTCTTCTTGTGGGATTGTCTGCCAGACGCTGGGGCCACAGTGAAGTGTGGACAC 1021 K E D A A V N C T A Q K I S T H K T P Q 3061 AAGGAAGACGCTGCAGTGAAATGCACAGCACAATAATTTCAACGCACAAAACCCCAAA 1041 K A T T V S S R G E N L V H Q I Q Y R E 3121 AAAGCCACAACAGTTTCTCAAGAGGAGAGAAGTCTAGTCCACCAAATTCATACCGGGAG 1061 M N S C L N A D D L D L M N S S G G H S 3181 ATGAATTTTGGCTGAATGCAGATGATCTGGACCTAATGAATTCCTCAGGAGGCCATCTCT 1081 E A H * K G K W E F I T Q 3241 GAGGCACACTGAAAAGGAAATGGGAATTTATAACCCAG	
1 MSKLRMVLLE DSGSADVRRH FVNLSPTTIA VVLLLRACFV TSSLGGTTKE LRLVDGENKC 61 SGRVEVKIQE EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCPAIIKA TGWANSSAGS GRIWMDHVSC	SEQ ID NO:40

SEQÜÊNCIA		ID NO
121	RGNESALWDC KHDGWGKHSN CTHQQDAGVT CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQGGW	
181	GTVCDDNFNV NHASVVCKQL ECGSAVSFSG SANFGEESGP IWFDLLICNG NESALWNCKH	
241	QGWGKHNCNDH AEDAGVICSK GADLSLRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDHA	
301	AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEGFGHIWL DSVSCQGHPE AVWQCKHHEW GKHYCNHNE	
361	AGVTCSDGSD LELRLRGGS RCAGTVEVEI QRLGKVCDR GWGLKEADV CRQLGCGSAL	
421	KTSYQVYSKI QATNMWFLS SCNGNETSLW DCKNWQWGL TCDHYEAKI TCSAHREPR	
481	VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG SVCSDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFEGENGQI	
541	WAEFQCEGH ESHLSLCPVA PRPEGTCSHS RDVGVCSTRY TEIRLVNGKT PCEGRVELKT	
601	LNAWGLCNS HWDIEDAHLV CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVVRHMF HCTGTGEQHM	
661	DCPVTALGAS LCPSGQVASV ICSGNQSQT SSCNSSSLGP TRPTIPEESA VACIESQQLR	
721	LVNGGGRGAG RVEIYHEGSW GTICDDSWDL SDAHVVCRQL CGGEAINATG SAHFGEETGP	
781	IWLDEMCKNG KESRIWQCHS HGWQQNCRH KEDAGVICSE FMSLRILTSEA SREACAGRLE	
841	VFYNGAWGSV GRSNMSETTV GVVCRLGCA DKGKINSASL DKAMSIPMWV DNVQCPKGP	
901	TLWQCPSSPW EKRLARPSEE TWITCDNKM LQEGPTSCSG RVEIWHGGSW GTVCDDSWDL	
961	NDAQVVCQL GCGPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCKG NESSLWDPCA RRGHSECGH	
1021	KEDAAVNCTA QKISTHKTPQ KATTVSSRGE NLVHQIQYRE MNSCLNADDL DLMNSSGGHS	
1081	EAH	
1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H 1 ATGAGCAAACCTCAGAATGGTCTACTTGAAGACTCTGGATCTGCTGACGTCAGAAGACAT 21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V 61 TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCTGTGTTGTC 41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C 121 ACCAGTTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAACAAAGTGT 61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W 181 AGTGGGAGAGTGAAGTGAATCCAGGAGGAGTGGGAACGGTGTGTAATAATGGCTGG 81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A 241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTGTGAACAGCTGGGATGTCCAACCTGCTATCAAGCC 101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C 301 ACTGGATGGGCTAATTCAGTGCAGGTTCTGGACGCTTGGATGGATCATGTTTCTTGT 121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N 361 CGTGGGAATGAGTCAGTCTTGGGACTGCAACATGATGGATGGGAAAGCATAGTAAC 141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R 241 TGTACTCACCACCAAGATGCTGGAGTGACTTGTCTAGATGGATCCGATTGGAAATGAGG 161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W 481 CTGACGAATGGAGGAATATGTGTCTGGAAGAATAGAGATCAAAATCCAGGACAGTGG 181 G T V C D D N F N I N H A S V V C K Q L 541 GGAACAGTGTGTGATGATAACTTCAACATCAATCATGCATCTGTGGTTTGTAAACAACTT 201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P 601 GAATGTGGAAGTCTGTGAGTTTCTCTGGTTCAGCTAATTTTGGAGAAGGCTCTGGACCA 221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H 661 ATCTGGTTTGTATGATCTTATATGCAACGGAATGAGTCAGCTCTCTGGAAGTGCACAT 241 Q G W G K H N C D H A E D A G V I C S K 721 CAAGGATGGGAAAGCATAACTGTGATCATGCTGAGGATGCTGGAGTGTGTTGCTCAAAG 261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E 781 GGAGCAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGATGGAGTCACTGAATGTTGAGGAAGATTAGAA 281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S H D A 841 GTGAGATTCCAAGGAGAATGGGGGACAATATGTGATGACGGCTGGGACAGTCATGATGCT 301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N 901 GCTGTGGCATGCAAGCAACTGGGATGTCCAACCTGCTATCACCGCCATTGGTTCGAGTTAAC 321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P 961 GCCAGTGGGATTTGGACACATCTGGCTTGACAGTGTCTTCTGCGAGGAGATGAACCT 341 A V W Q C K H H E W G K H Y C N H N E D 1021 GCGGTCTGGCAATGTAACACCATGAATGGGGAAGCATTATTGCAATCACAATGAAGAT 361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G S 1081 GCTGGCGTAACATGTTCTGATGGATCAGATCTGGAGCTAAGACTTAGAGGTGGAGGCAGC 381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R 1141 CGTGTGCTGGGACAGTTGAGGTGGAGATTGAGAGACTGTAGGGAAGGTGTGTGACAGA 401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L 1201 GGCTGGGACTGAAAGAAGCTGATGTGGTTTGCAGGCAGCTGGGATGTGGATCTGCACTC 421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S 1261 AAAACATCTATCAAGTATACTCCAAATCCAGGCAACAACATGTGGCTGTTTCTAAGT 441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L 1321 AGCTGTACGGAATGAACTTCTCTTTGGGACTGCAAGAAGCTGGCAATGGGGTGGACTT 461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L 1381 ACCTGTGATCATTGAAGAAGCCAAATACCTGCTCAGCCCACAGGGAACCCAGATG 481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G 1441 GTTGGAGGAGACATCCCTGTTCTGGACGCTTGAAGTGAAGCATGGTGACACATGGGGC 501 S V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q 1501 TCCGTCTGTGATTGCGATTCTCTCTGGAAGCTGCCAGCTTCTATGAGGGAATTACAG 521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I 1561 TGTGGCACAGTCGTTCTATCTCTGGGGGAGCTCACTTTGGAGAGGGAAATGGACAGATC 541 W A E E F Q C E G H E S H L S L C P V A 1621 TGGGCTGAAGAATCCAGTGTGAGGACATGAGTCCCATTCTTCACTCTGCCCAGTAGCA 561 P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y 1681 CCCCCTCAGAAAGTGTAGCCACAGCAGGATGTTGGAGTAGTCTGCTCAAGATAC 581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T 1741 ACAGAAATTCGCTTGGTGAATGGCAAGACCCCATGTGAGGGCAGAGTGGAGCTCAAACG 601 L N A W G S L C N S H W D I E D A H V L 1801 CTTAATGCCTGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCACGTTCTT		SEQ ID NO:41 e 42

SEQUÊNCIA		ID NO
621 C Q Q L K C G V A L S T P G G A H F G K		
1861 TGCCAACAACCTTAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTACCCCAGGAGGACACATTTTGGAAAA		
641 G N G Q V W R H M F H C T G T E Q H M G		
1921 GGAAATGGTCAGGTCTGGAGGCATATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGCAGCATGGGA		
661 D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V		
1981 GATTGTCTGTAACCTGCTTGGGTGCTTCACTATGTCCTTTCAGGCAAGTGGCCTCTGTA		
681 I C S G N Q S Q T L S S C N S S S L G P		
2041 ATTTGCTCAGGAAACAGTCCCAACACTGTCTCGTGAATTCATCATCTCTGGGCCCCA		
701 T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R		
2101 ACAAGGCCATACCATTCCAGAAGAAAGTGTGTGGCCTGCATAGAGAGTGGTCAACTTCGC		
721 L V N G G G R C A G R V E I Y H E G S W		
2161 TTGGTAAATGGAGGAGTTCGTGTGCTGGGAGAGTAGAGATTTATCATGAGGGCTCCTGG		
741 G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L		
2221 GGCACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCCACGTTGGTGTGACAGACAGTG		
761 G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P		
2281 GGCTGTGGAGAGGCCATTAATGCCACTGTTCTGCTCATTTTGGAGAAGGAACAGGGCCC		
781 I W L D E M K C N G K E S R I W Q C H S		
2341 ATCTGGCTGGATGAGATGAAATGCAATGGAAAAGAAATCCCGTATTGGCAGTGCCATTCA		
801 H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E		
2401 CATGGCTGGGGGAGCAAACTGCAGGCACAAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGCTCAGAG		
821 F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E		
2461 TTCATGTCTCTGAGACTGACCACTGAAGCCAGCAGAGAGCCTGTGCAGGGCGTCTAGAA		
841 V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V		
2521 GTTTTTTACAACGAGCTTGGGGCAGTGTGGCAGGAGTAACATGTCTGAAACCATCTGTG		
861 G V V C R Q L G C A D K G K I N S A S L		
2581 GGTGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGCAGACAAAGGGAAAATCAACTCTGCATCTTTA		
881 D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D		
2641 GACAAGGCCATGTCCATTCCCATGTGGGTGGACAATGTTTCACTGTCCAAAGGAGCTGAC		
901 T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E		
2701 ACCTGTGGCAGTGCCCATCTCATCTGGGAGAAGAGACTGGCCAGGCCCTCGGAGGAG		
921 T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G		
2761 ACCTGGATCACATGTGACAACAAGATGAGACTACAAGAAGGACCCACTTCTGTCTGGA		
941 R V E I W H G S W G T V C D D S W D L		
2821 CGTGTGGAGATCTGGCACGGAGTTTCTGGGGGACAGTGTGTGATGACTCTGGGACTTG		
961 N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K		
2881 AACGATGCTCAGGTGTGTCAACAACCTTGGCTGTGGTCCAGCTTTGAAAGCATTCAAA		
981 E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G		
2941 GAAGCAGAGTTTGGTCAGGGGACTGGACCCATATGGCTCAATGAAGTGAAGTGCAAAGGG		
1001 N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H		
3001 AATGAGTCTTCTTGTGGGATTGTCTGCGAGAGCTGGGGCCACAGTGAGTGTGGACAC		
1021 K E D A A V N C T A Q K I S T H K T P Q		
3061 AAGGAAGACGCTGCAGTGAATTGCACAGCACAAAAAATTCAACGCACAAAAACCCCAAA		
1041 K A T T G R S F L I A F G I L G V V L L		
3121 AAAGCCACAACAGGTCCGTCATTCCTTATTGCATTCCGAATCCTTGGAGTTGTTCTCTTG		
1061 A I F V A L F L T Q K R R Q R Q R L T V		
3181 GCCATTTTCTGTCGATTATTCTTGACTCAAAGCGAAGACAGACAGCGGCTTACAGTT		
1081 S S R G E N L V H Q I Q Y R E M N S C L		
3241 TCCTCAAGAGGAGAGAACTTAGTCCACCAAAATTAATACCGGAGATGAATTCTTGCTTG		
1101 N A D D L D L M N S S G G H S E A H		
3301 AATGCAGATGATCTGGACCTAATGAATTCCTCAGGAGGCCATTCTGAGGCACAC		
1 MSKLRMVLLE DSGSADVRH FVNLSPTTIA VVLLLRACFV TSSLGGTTKE LRI/VDGENKC		SEQ ID
61 SGRVEVKIQE EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCP/TAIKA TGWANSSAGS GRI/WMDHVS		NO:42
121 RGNESALWDC KHDGWGKHSN CTHQQDAGVT CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQGGW		
181 GTVCDNFNI NHASVVCQQL ECGSAVSFSG SANFGEHSGP IWFDLLICNG NESALWNCKH		
241 QGWGKHNCDH AEDAGVICS GADLSRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSHDA		
301 AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEGFGHIWL DSVSCQGHPE AVWQCKHHEW GKHYCNHNE		
361 AGVTCSDGSD LELRLRGGGS RCAGTVEVEI QRLLGKVCDR GWGLKEADV CRQLGCGSAL		
421 KTSYQVYSKI QATNMWLFSL SCNGNETSLW DCKNWQWGL TCDHYEAKI TCSAHREPL		
481 VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG SVCDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFGEENGQI		
541 WAEFQCEGH ESHLSLCPVA PRPEGTCSSHS RDVGVCSSRY TEIRLVNGKT PCEGRVELKT		
601 LNAWGLSCLNS HWDIEDAHVL CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVWRHMF HCTGTEQHM		
661 DCPVTALGAS LCPSGQVASV ICSGNQSQTLL SSCNSSSLGP TRPTIPEESA VACIESGQLR		
721 LVNGGGRGACG RVEIYHEGSW GTICDDSDWL SDAHVVCRQL GCGEAINATG SAHFGEETGP		
781 IWLDEMKNCG KESRIWQCHS HGWQQNCRH KEDAGVICSE FMSLRILTSEA SREACAGLE		
841 VFYNGAWGSV GRSNMSETTV GVVCRLGCA DKGKINSASL DKAMSIPMWV DNVQCPKGP		
901 TLWQCPSSPW EKRLARPSEE TWITCDNKMRLQEGPTSCSG RVEIWHGGSW GTVCDSDWL		
961 NDAQVVCQQL CGCPALKAFK BAEFGQGTGP IWLNEVKCKG NESSLWDPCA RRGHSECGH		
1021 KEDAAVNCTA QKISTHKTPQ KATTGRSFLI AFGILGVLL AIFVALFLTQ KRRQRRLTV		
1081 SSRGENLVHQ IQYREMNLSL NADDLDLMS GSGHSEAH		
1 M S K L R M V L L E D S G S A D V R R H		SEQ ID
1 ATGAGCAAACCTCAGAATGGTGCTACTTGAAGACTCTGGATCTGCTGACGTCAGAAGACAT		NO:43 e
21 F V N L S P F T I A V V L L L R A C F V		44
61 TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCACTATTGCTGTGGTCTTACTTCTCCGTGCTGTTTGTG		
41 T S S L G G T T K E L R L V D G E N K C		
121 ACCAGTTCTCTTGGAGGAACAACCAAGGAGCTGAGGCTAGTGGATGGTGAAGCAAGTGT		
61 S G R V E V K I Q E E W G T V C N N G W		
181 AGTGGGAGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT		
81 S M E A V S V I C N Q L G C P T A I K A		
241 AGCATGGAAGCAGTCTCTGTGATTGTGAACACAGCTGGGATGTCCAACTGCTATCAAAGCC		

SEQUÊNCIA	ID NO
101 T G W A N S S A G S G R I W M D H V S C 301 ACTGGATGGGCTAATTCAGTGCAGGTTCTGGACGATTTGGATGGATCATGTTTCTTGT 121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H S N 361 CGTGGGAATGAGTCAGCTCTTTGGGACTGCAAACATGATGGATGGGGAAGCATAGTAAC 141 C T H Q Q D A G V T C S D G S D L E M R 421 TGTACTCACCAACAAGATGCTGGAGTGACTTGCTCAGATGGATCCGATTGGAAATGAGG 161 L T N G G N M C S G R I E I K F Q G Q W 481 CTGACGAATGGAGGAATATGTGTTCTGGAAGAATAGAGATCAAATCCAAGGACAGTGG 181 G T V C D D N F N I N H A S V V C K Q L 541 GGAACAGTGTGTGATGATAACTTCAACATCAATCATGCATCTGTGGTTTGTAAACAACTT 201 E C G S A V S F S G S A N F G E G S G P 601 GAATGTGGAAGTGCTGTCAGTTTCTCTGGTTTCTGCTAATTTGGAGAAGGCTCTGGACCA 221 I W F D D L I C N G N E S A L W N C K H 661 ATCTGGTTTGTATGATCTTATATGCAACGGAAATGAGTCAGCTCTCTGGAAGTCAAAACAT 241 G W G K H N C D H A E D A G V I C S K 721 CAAGGATGGGGAAGCATAACTGTGATCATGCTGAGGATGCTGGAGTGATTGCTCAAAG 261 G A D L S L R L V D G V T E C S G R L E 781 GGACGAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGATGGAGTCACTGAATGTTGAGGAAGATTAGAA 281 V R F Q G E W G T I C D D G W D S H D A 841 GTGAGATTTCAAGGAGAATGGGGGACAATATGTGATGACGGCTGGGACAGTCATGATGCT 301 A V A C K Q L G C P T A I T A I G R V N 901 GCTGTGGCATGCAAGCAACTGGGATGTCCAAGTCTATCACCGCCATTGGTCGAGTTAAC 321 A S E G F G H I W L D S V S C Q G H E P 961 GCCAGTGAGGGATTGGACACATCTGGCTTGACAGTGTCTTGGCAGGGACATGAACCT 341 A V W Q C K H H E W G K H Y C N H N E D 1021 GCGTCTGGCAATGTAACACCATGAATGGGGAAGCATTATTGCAATCACAATGAAGAT 361 A G V T C S D G S D L E L R L R G G G S 1081 GCTGGCGTAACATGTTCTGATGGATCAGATCTGGAGCTAAGACTTAGAGGTGGAGGCAGC 381 R C A G T V E V E I Q R L L G K V C D R 1141 CGCTGTGCTGGGACAGTTGAGGTGGAGATTGAGAGACTGTAGGGAAGGTGTGTGACAGA 401 G W G L K E A D V V C R Q L G C G S A L 1201 GGCTGGGGACTGAAAGAAGCTGATGTGGTTTGCAGGCAGCTGGGATGTGGATCTGCACTC 421 K T S Y Q V Y S K I Q A T N M W L F L S 1261 AAAACATCCTATCAAGTATACTCCAAATCCAGGCAACAAACATGTGGCTGTTTCTAAGT 441 S C N G N E T S L W D C K N W Q W G G L 1321 AGCTGTAAACGGAATGAACTTCTCTTTGGGACTGCAAGAACTGGCAATGGGGTGGACTT 461 T C D H Y E E A K I T C S A H R E P R L 1381 ACCTGTGATCACTATGAAGAAGCCAAATACCTGCTCAGCCCACAGGGAACCCAGACTG 481 V G G D I P C S G R V E V K H G D T W G 1441 GTTGGAGGAGACATTCCTGTTCTGGACGCGTTGAAGTGAAGCATGGTGACACATGGGGC 501 S V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q 1501 TCCGTCTGTGATTGCGATTCTCTCTGGAAGCTGCCAGCGTTCTATGCGAGGAATTACAG 521 C G T V V S I L G G A H F G E G N G Q I 1561 TGTGGCACAGTCGCTCTATCTCTGGGGGAGCTCACTTTGGAGAGGGAAATGGACAGATC 541 W A E E F Q C E G H E S H L S L C P V A 1621 TGGGCTGAAGAATTCCAGTGTGAGGACATGAGTCCCATCTTTCACTCTGCCAGTAGCA 561 P R P E G T C S H S R D V G V V C S R Y 1681 CCCGCCCCAGGAAGCACTGTAGCCACAGCAGGGATGTTGGAGTAGTCTGCTCAAGATAC 581 T E I R L V N G K T P C E G R V E L K T 1741 ACAGAAATTCGCTTGGTGAATGGCAAGCCCCATGTGAGGGCAGAGTGGAGCTCAAAACG 601 L N A W G S L C N S H W D I E D A H V L 1801 CTTAATGCCTGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGACATAGAAGATGCCACGTTCTT 621 C Q Q L K C G V A L S T P G G A H F G K 1861 TGCCCAACAACTTAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTACCCAGGAGGACACATTTTGGAAAA 641 G N G Q V W R H M F H C T G T E Q H M G 1921 GGAAATGGTCAGGTCTGGAGGCATATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGCACATGGGA 661 D C P V T A L G A S L C P S G Q V A S V 1981 GATTGTCCTGTAAGTCTGCTGGGTGCTTCACTATGTCCTTCAGGGCAAGTGGCCTCTGTA 681 I C S G N Q S Q T L S S C N S S S L G P C 2041 ATTTGCTCAGGAACCACTGCCAAACATGTCTCTGCAATTCATCTCTGGGCCCA 701 T R P T I P E E S A V A C I E S G Q L R 2101 ACAAGGCCTACCATTCCAGAAGAAAGTGCTGTGGCTGCATAGAGAGTGGTCAACTTCGC 721 L V N G G G R C A G R V E I Y H E G S W 2161 TTGGTAAATGGAGGAGTCTGCTGTGGGAGAGTAGAGATTTATCATGAGGGCTCCTGG 741 G T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L 2221 GGCACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCCACGTTGGTGCGACAGCTG 761 G C G E A I N A T G S A H F G E G T G P 2281 GGCTGTGGAGAGGCCATTAATGCCACTGGTTCTGCTCATTTTGGAGAAGGAACAGGGCCC 781 I W L D E M K C N G K E S R I W Q C H S 2341 ATCTGGCTGGATGAGATGAAATGCAATGGAAAAGATCCCGTATTTGGCAGTGCCATTCA 801 H G W G Q Q N C R H K E D A G V I C S E 2401 CATGGCTGGGGCAGCAAACTGCAGGCACAAGGAGGATGCAAGGATTATCTGCTCAGAG 821 F M S L R L T S E A S R E A C A G R L E 2461 TTCAATGCTCTGAGACTGACCAAGTGAAGCCAGCAGAGAGGCTGTGAGGGCGTCTAGAA 841 V F Y N G A W G S V G R S N M S E T T V 2521 GTTTTATACAACGAGCTTGGGGCAGTGTGGCAGGAGTAACATGTCTGAAACCACTGTG 861 G V V C R Q L G C A D K G K I N S A S L 2581 GGTGTGGTGTGACAGCAGCTGGGCTGTGACAGACAAAGGGAATCAACTCTGCATCTTA 881 D K A M S I P M W V D N V Q C P K G P D 2641 GACAAGGCCATGTCCATTCCCATGTGGGTGGACAATGTTCACTGTCCAAAAGGACCTGAC 901 T L W Q C P S S P W E K R L A R P S E E 2701 ACGTGTGGCAGTGCCCATCATCTCCATGGGAGAAGAGACTGGCCAGGCCCTCGGAGGAG 921 T W I T C D N K M R L Q E G P T S C S G 2761 ACCTGGATCACATGTGACAACAAGATGAGACTACAAGAAGGACCCACTTCTGTCTGGA	

SEQUÊNCIA		ID NO
941 R V E I W H G G S W G T V C D D S W D L		
2821 CGTGTGGAGATCTGGCACGGAGGTTCTTGGGGGACAGTGTGTGATGACTCCTGGGACTTG		
961 N D A Q V V C Q Q L G C G P A L K A F K		
2881 AACGATGCTCAGGTGGTGTGTCAACAACCTTGGCTGTGGTCCAGCTTTGAAAGCATTCAAA		
981 E A E F G Q G T G P I W L N E V K C K G		
2941 GAAGCAGAGTTTGGTCAGGGGACTGGACCCATATGGCTCAATGAAGTGAAGTGCAAAGGG		
1001 N E S S L W D C P A R R W G H S E C G H		
3001 AATGAGTCTTCTTGTGGGATTGTCTGCCAGACGCTGGGGCCACAGTGAGTGTGGACAC		
1021 K E D A A V N C T A Q K I S T H K T P Q		
3061 AAGGAAGACGCTGCAGTGAATTGCACAGCACAAAAAATTCAACGCACAAAACCCACAA		
1041 K A T T G G Q S F L I A F G I L G V V L L		
3121 AAAGCCACAACAGGTCACTTCTTATTCATTCGGAATCCTTGGAGTTGTCTCTTG		
1061 A I F V A L F L T Q K R R Q R Q R L T V		
3181 GCCATTTTCGTCGATTATTCTTGACTCAAAAGCGAAGACAGAGACAGCGGCTTACAGTT		
1081 S S R G E N L V H Q I Q Y R E M N S C L		
3241 TCCTCAAGAGGAGAGAACTTAGTCCACCAATTCAATACCGGAGATGAATTCTTGCCTG		
1101 N A D D L D L M N S S E N S N E S A D F		
3301 AATGCAGATGATCTGGACCTAATGAATTCTCAGAAAATTCCAATGAGTCAGCTGATTTC		
1121 N A A E L I S V S K F L P I S G M E K E		
3361 AATGCTGCTGAATAATTCTGTGTCTAAATTCTTCTCTATTCTGGAATGGAAGGAG		
1141 A I L R H T E K E N G N L		
3421 GCCATTCTGAGGCACACTGAAAAGGAAATGGGAATTTA		
1 MSKLRLVLE DSGSADVRRH FVNLSFFTIA VVLLLRACFV TSSLGGTTKE LRLVDGENKC		SEQ ID NO: 44
61 SGRVEVKIQE EWGTVCNNGW SMEAVSVICN QLGCPATAKA TGWANSSAGS GRIWMDHVSC		
121 RGNESALWDC KHDGWGKHSN CTHQQDAGVT CSDGSDLEMR LTNGGNMCSG RIEIKFQGW		
181 GTVCCDDFNI NHASVVCQQL ECGSAVSFSG SANFEGSGP IWFDDLICNG NESALWNCKH		
241 QGWGKHNCNDH AEDAGVICSK GADLSLRLVD GVTECSGRLE VRFQGEWGTI CDDGWDSDHA		
301 AVACKQLGCP TAITAIGRVN ASEGFGHIWL DSVSCQGHF AVWQCKHHEW GKHYCNHNED		
361 AGVTCSGSD LELRLRGGS RCAGTVEVEI QRLGKVCDR GWGLKEADV CRQLGCGSAL		
421 KTSYQVYSKI QATNMWFLS SCNGNETSLW DCKNWQWGL TCDHYEEAKI TCSAHREPR		
481 VGGDIPCSGR VEVKHGDTWG SVCDSDFSLE AASVLCRELQ CGTVVSILGG AHFEGENGQI		
541 WAEFQCEGH ESHLSLCPVA PRPEGTCSHS RDVGVCVSR YTEIRLVNGKT PCEGRVELKT		
601 LNAWGSCLNS HWDIEDAHLV CQQLKCGVAL STPGGAHFGK GNGQVVRHMF HCTGTEQHMG		
661 DCPVTALGAS LCPSGQVASV ICSGNQSQTL SSCNSSSLGP TRPTIPEESA VACIESGQLR		
721 LVNGGGRCAG RVEIYHEGSW GTICDDSWDL SDAHVVCRQL GCGEAINATG SAHFEGGTGP		
781 IWLDEMKNCG KESRIWQCHS HGWGQQNCRH KEDAGVICSE FMSLRLTSEA SREACAGRLE		
841 VFYNGAWGSV GRSNMSETTV GVVCRLGCA DKGKINSASL DKAMSIPMWV DNVQCPKQPD		
901 TLWQCPSPW EKRLARPSEE TWITCDNKMR LQEGPTSCSG RVEIWHGGSW GTVCDDSWDL		
961 NDAQVVCQQL CGCPALKAFK EAEFGQGTGP IWLNEVKCKG NESSLWD CPA RRWGHSECGH		
1021 KEDAAVNCTA QKISTHKTPQ KATTGQSFLI AFGILGVLL AIFVALFLTQ KRRQRQLRTV		
1081 SSRGENLVHQ IQYREMNSCL NADDLDLMNS SENSNESADF NAAELISVSK FLPISGMEKE		
1141 AILRHTEKEN GNL		

Exemplo 10 - Clonagem e caracterização de CD163 canino de células DH82.

Um iniciador para frente 5'simianCD163 (SEQ ID NO: 28) (5'-CACCGGAATGAGCAAACCTCAGAATGG-3' baseado CD163 humano) e um iniciador para trás HuCD163-3'Kpn (SEQ ID NO: 29) (5'-GCTCCGGTACCTAGTCCAGGTCTTCATCAAGGTATCTTA-3') foram utilizados para amplificar o cDNA de CD163 de células DH82. O RNA celular total foi preparado partindo de células DH82 utilizando o kit RNeasy. Os parâmetros de RT-PCR eram os mesmos que os descritos no Exemplo 4. Os produtos de RT-PCR foram clonados de forma direcionada no vetor pCD-NA3.1D/V5/His/TOPO de acordo com a instrução do fabricante. Vários clones contendo insertos grandes foram analisados. Vários clones com grandes insertos foram analisados e estes se encaixavam dentro dos padrões de processamento de v2 ou de v3 observados em outras espécies. A variação v2 não possui um éxon de 81 nucleotídeos (E81) em relação à variação, que

resulta em uma alteração no quadro de leitura e seqüências de aminoácidos no terminal carboxi alternativas. O cDNA de CD163 canino v2 de células DH82 codifica um peptídeo de 1115 aminoácidos. Quando comparada com as seqüências no banco de dados Genbank, é 83,9% idêntica ao CD163 humano (Genbank Z22968), 85,1% idêntica ao CD163 de porco (Genbank AJ311716) e 74,3% idêntica ao CD163 de camundongo (Genbank AF274883). O nucleotídeo e as seqüências de aminoácidos de duas variações de processamento observadas nas células DH82 são fornecidos abaixo (SEQ ID NOS: 45-48).

SEQÜÊNCIA	ID NO
1 M S K L R M V P H G N S G S A D F R R C	SEQ
1 ATGAGCAAACCTCAGAATGGTCCCACATGGAACTCTGGATCTGCTGACTTTAGAAGATGT	ID
21 F A L L C P S A V A V V S I L S T C L M	NO:
61 TTGCCCCTCTGTGTCCCTCTGCTGTGGCTGTGGTCTCCATTCTCAGTACCTGTTTGATG	45 e
41 T N S L G R A D K E M R L T D G E D N C	46
121 ACCAATTCTCTTGGGAGAGCAGATAAAGAGATGAGGCTAACGGATGGTGAAGACAATTGC	
61 S G R V E V K V Q E E W G T V C N N G W	
181 TCCGGGAGAGTGAAGTGAAGTCCAGGAGGAGTGGGAACGGTGTGTAATAATGGCTGG	
81 G M D E V S V I C R Q L G C P T A I K A	
241 GGCATGGATGAAGTCTCTGTGATTTGCAGGCAGCTGGGATGTCCCACTGCTATCAAAGCC	
101 A G W A N S R A G S G R I W M D H V S C	
301 GCTGGATGGGCCAATTCCAGGGCAGGCTCTGGACGAATCTGGATGGATCATGTTCTTGT	
121 R G N E S A L W D C K H D G W G K H N C	
361 CGAGGGAATGAATCTGCTCTCTGGGACTGCAACATGATGGATGGGGAAAGCACAACCTGC	
141 S H Q Q D A G V T C S D G S S L E M R L	
421 AGTCATCAACAGGATGCTGGAGTAACCTGTTTCAAGATGGATCCAGTTTGGAGATGAGGTTG	
161 M N G G N Q C S G R I E V K F Q G Q W G	
481 ATGAACGGCGGAAACCAAGTGTCTGGCAGAAATAGAAGTCAAGTTCAGGGACAGTGGGGA	
181 T V C D D N F N I D H A S V V C K Q L E	
541 ACAGTGTGTGATGACAACCTCAACATAGATCATGCTTCTGTGGTTTGTAAACAGCTCGAA	
201 C G S A V S G S A N F G E G S G P I	
601 TGTGGAAGTGTGTGCTGCTTCTCTGGTTCAGCTAATTTGGAGAAGGTTCTGGGCCAATC	
221 W F D D L V C S G N E S A L W N C K H E	
661 TGGTTTGATGATCTTGTGTGAGTGGAAATGAGTCACTCTCTGGAAGTGCAGCATGAA	
241 G W G K H N C D H A E D V G V I C L D G	
721 GGATGGGGAAGCATAACTGTGATCACGCTGAGGATGTTGGAGTGATTTGCTTGGATGGA	
261 A D L S L R L V D G V T E C S G R L E V	
781 GCAGATCTGAGCTGAGACTGGTAGATGGAGTCACTGAATGTTTCAAGGAAGATTAGAAGTA	
281 K F Q G E W G T V C D D D G W D S N D A A	
841 AAATTCGAAGGGGAATGGGGACAGTGTGTGATGATGGCTGGGATAGTAATGATGCTGCT	
301 V V C K Q L G C P T A V T A I G R V N A	
901 GTGGTATGTAAACAACCTGGGATGCCCACTGCTGTACCCCATTTGGTCCAGTTAACGCC	
321 S E G S G H I W L D N L S C Q G D E S A	
961 AGTGAGGGAAGTGGACACATTGGCTTGACAATCTTCTGCAAGGAGACGAATCTGCT	
341 L W Q C R H H E W G K H Y C N H N E D A	
1021 CTCTGGCAGTGTAGACACCATGAATGGGGAAGCATTATTGCAATCATAATGAAGATGCT	
361 G V T C S D G S D L E L R L V G G G S R	
1081 GGTGTGACATGTTCTGATGGATCAGACCTGGAGCTGAGACTTGTCTGGTGGAGGCAGCCGC	
381 C A G T V E V E I Q K L L G K V C D R G	
1141 TGTGCTGGGACAGTGGAGGTTGAAATTCAGAACTGCTAGGGAAAGTATGTGATAGAGGC	
401 W G L K E A D V V C K Q L G C G S A L K	
1201 TGGGACTGAAAGAAGCCGATGTGGTTTGAAGCAGTGGGATGTGGATCTGCTCTCAAA	
421 T S Y Q R Y S K V K A T N T W L F L S R	
1261 ACGTCCATCAGCGTTATTCCAAAGTTAAGGCAACAACACATGGCTGTTTTTAAGCCGC	
441 C S G N E T S L W D C K N W Q W G G L S	
1321 TGAGTGGCAATGAAACTTCCCTTTGGGACTGCAAGAACTGGCAGTGGGGTGGACTGAGC	
461 C D H Y E E A K V T C S A H R E P R L V	
1381 TGTGATCACTATGAAGAAGCTAAAGTTACCTGCTCAGCCCACAGGGAACCCAGACTAGTT	
481 G G D I P C S G R V E V K H G D T W G T	
1441 GGAGGATATTCCCTGCTGCTGTTGAAGTGAACATGGTGACACATGGGGCACC	
501 V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q C	
1501 GTCTGTGATTCCGACTTCTCTTTGGAAGCTGCCAGTGTGCTGTGCAGAGAGTTACAGTGT	
521 G T V I S I L G G A H F G E G N G Q I W	
1561 GGCACAGTCACTCCATCCTAGGGGAGCTCACTTTGGAGAAGGAAATGGACAGATCTGG	
541 A E E F Q C E G Q E S H L S L C S V A S	
1621 GCTGAAGAATTCCAGTGTGAGGGCAGGAGTCCCATTCTCACTCTGTTTCACTAGCTCT	
561 R P D G T C S H S R D V G V V C S R Y T	
1681 CGCCCAGATGGGACCTGTAGCCACAGCAGGGATGTTGGAGTCTGCTCAAGATACACG	
581 E I R L V N G Q S P C E G R V E L K I L	
1741 GAAATCCGCTTGGTGAATGGCCAGTCCCCGTGTGAAGGAAGAGTGGAGCTCAAGATACTT	

SEQUÊNCIA		ID NO
601	G N W G S L C N S H W D I E D A H V F C	
1801	GGGAAC TGGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCCATGTTTCTGT	
621	Q Q L K C G V A L S I P G G A H F G K G	
1861	CAGCAGCTCAAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTATTCCGGGAGGAGCACATTTTGGGAAAGGA	
641	S G Q I W R H M F H C T G T E Q H M G D	
1921	AGTGGTCAGATCTGGAGGCACATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGCACATGGGAGAT	
661	C P V T A L G A T L C S A G Q V A S V I	
1981	TGCCCTGTAAC TCTCTGGGCGCGACGCTGTGTCTGTCTGGGCAAGTGGCCTCTGTAATC	
681	C S G N Q S Q T L S P C N S T S L D P T	
2041	TGCTCAGGAAATCAGAGCCAGACGCTATCCCCATGCAATTCAACATCTCTGGACCCAACA	
701	R S T T S E E S A V A C I A S G Q L R L	
2101	AGATCTACCAC TTCGGAAGAAAGTGTCTGTGCTTGTATTGCGAGTGGGCAACTTCGCCTG	
721	V N G G G R C A G R I E V Y H E G S W G	
2161	GTAATGGAGGCGGTGCTGTGTCTGGGAGAATAGAGGTCTACCATGAGGGCTCCTGGGGC	
741	T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L G	
2221	ACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGTGTATGCCATGTGGTGTGCAGACAGCTGGGC	
761	C G V A I N A T G S A H F G E G T G P I	
2281	TGTGGTGGCCATTAATGCCACTGGCTCTGCTCAATTTGGGGAAGGAACAGGGCCATC	
781	W L D E V N C N G K E S H I W Q C R S H	
2341	TGGCTGGACGAGGTGAAC TGTAAATGGAAGGAATCTCATATCTGGCAATGCCGCTCACAC	
801	G W G Q H N C R H K E D A G V I C S E F	
2401	GGCTGGGGGCAACACAAC TGCAGACATAAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGCTCAGAGTTC	
821	M S L R L I D E T S R D I C A G R L E V	
2461	ATGTCTCTCAGACTGATTGATGAAACCAGCAGACATCTGTGCAGGGCGTCTTGAAGTT	
841	F Y N G A W G S V G K S N M S A T T V E	
2521	TTTACATGGAGCTTGGGGCAGCGTTGGCAAGAGTAATATGTCTGCAACCACTGTGGAG	
861	V V C R Q L G C A D K G S I N P A S D	
2581	GTGGTATGCAGGCAACTGGGTTGTGCAGACAAGGGGAGCATCAACCTGCATCTTCAGAC	
881	K P M S R H M W V D N V Q C P K G P D T	
2641	AAGCCCATGTCCAGGCACATGTGGGTGGACAATGTCCAGTGTCCAAAGACCTGACACC	
901	L W Q C P S S P W K Q R V A S S S E E T	
2701	TTATGGCAGTGCCCATCTTCTCCATGGAACAGAGAGTGGCCAGTTCTTCAGAGGAGACC	
921	W I T C A N K I R L Q E G T S N C S G R	
2761	TGGATCACATGTGCCAACAAGATAAGACTTCAAGAAGGAACCTCTAATTTCTGACGCT	
941	V E L W H G G S W G T V C D D S W D L E	
2821	GTGGAGCTTGGCAGCGAGTTCTTGGGGACAGTGTGCGATGACTCCTGGGACCTTGAA	
961	D A Q V V C R Q L G C G P A L E A L K E	
2881	GATGCACAAGTGGTGTGTGACAGCTGGGCTGTGGCCAGCATTAGAAGCACTAAAAGAG	
981	A A F G Q G T G P I W L N D V K C K G N	
2941	GCAGCATTTGGTCAGGGGACTGGGCCTATATGGCTCAATGACGTGAAGTGCAAAGGGAAT	
1001	E S S L W D C P A R P W G H S D C G H K	
3001	GAGTCTTCTTGTGGGATTGCTCTGCTAGACCCTGGGGGCACAGTGTGCTGGCCACAAG	
1021	E D A A V R C S E I A M A Q R S S N P R	
3061	GAAGATGCTGCTGTGAGGTGCTCAGAAATGCAATGGCCCAAAGATCATCAAATCCTAGA	
1041	G H S S L V A L G I F G V I L L A F L I	
3121	GGTCACTCATCCCTTGTGTGATTTGGGATCTTTGGTGTCAATCTTCTGGCCTTTCTCATC	
1061	A L L L W T Q R R R Q Q Q R L T V S L R	
3181	GCTCTCTCTTGTGGACTCAAAGCGAAGACAGCAACAGCGGCTTACAGTTTCTTGTAGA	
1081	G E N S V H Q I Q Y R E M N S S L K A D	
3241	GGAGAGAATTCTGTCCACCAAATTCATACCGGGAATGAATCTTCCCTGAAAGCAGAT	
1101	D L D V L T S S E D H F E V H	
3301	GATCTGGACGTGCTGACTTCTCAGAAAGACCATTTTGGGTACAC	
1	MSKL R M V P H G N S G S A D F R R C	SEQ ID NO: 46
61	SGRVEVKVQE EWGTVCNNGW GMDEVSVICR QLGCPTAIKA AGWANSRAGS GRIWMDHVSC	
121	RGNESALWDC KHDGWGKHNC SHQQDAGVTC SDGSSLEMRL MNGGNQCSGR IEVKFQGGQWG	
181	TVCDDNFNID HASVVCKQLE CGSAVSFSGS ANFGEESGPI WFDDLVCNSR ESALWNCKHE	
241	GWGKHNCDDHA EDVGVICLDG ADLSLRLVDG VTECSGRLEV KFQGEWGTVC DDGWDSDNAA	
301	VVCKQLGCPT AVTAIGRVNA SEGSGHIWLD NLSCQGDSEA LWQCRHHEWG KHYCNHNEDA	
361	GVTCSGSDSL ELRLVGGGSR CAGTVEVEIQ KLLGKVC DRG WGLKEADVVC KQLGCGSALK	
421	TSYQRYSKVK ATNTWLFSLR CSGNETSLWD CKNWQWGLS CDHYEEAKVT CSAHREPRLV	
481	GGDIPCSGRV EVKHGDTWGT VCDSDFSLEA ASVLCRELQC GTVISILGGA HFGEENGQIW	
541	AEFQCEGQE SHLSLCSVAS RPDGTCSHSR DVGVCVSRYT EIRLVNGQSP CEGRVELKIL	
601	GNWGSCLNSH WDIEDAHVFC QQLKCGVALS IPGGAHFGKG SGQIWRHMFH CTGTEQHMGD	
661	CPVTALGATL CSAGQVASVI CSGNQSQTLS PCNSTSLDPT RSTTSEESAV ACIASGQLRL	
721	VNGGRCAGR IEVYHEGSWG TICDDSWDLS DAHVVCRLG CGVAINATGS AHFEGGTGPI	
781	WLDEVNCNGK ESHIWQCRSH GWGQHNCRHK EDAGVICSEF MSLRLIDETS RDICAGRLEV	
841	FYNGAWGSVG KSNMSATTVE VVCRQLGCAD KGSINPASSD KPMRHMWVD NVQCPKGPDT	
901	LWQCPSSPWK QRVASSEET WITCANKIRL QEGTSNCSGR VELWHGGSWG TVCDDSWDLE	
961	DAQVVCRQLG CGPALEALKE AAFGQGTGPI WLNDVKCKGN ESSLWDCPAR PWGHSDCGHK	
1021	EDAAVRCSEI AMAQRSSNPR GHSSLVALGI FGVILLAFIL ALLLWTQRRR QQQLRTVSLR	
1081	GENSVHQIQY REMNSSLKAD DLDVLTSSD HFEVH	
1 M	S K L R M V P H G N S G S A D F R R C	SEQ ID NO: 47
1	ATGAGCAAAC TCAAGATGGTCCCACATGGAACTCTGGATCTGCTGACTTTAGAAGATGT	
21	F A L L C P S A V A V V S I L S T C L M	
61	TTTGCCCTCTTGTGTCCCTCTGCTGTGGCTGTGGTCTCCATTCTCAGTACCTGTTTGATG	
41	T N S L G R A D K E M R L T D G E D N C	
121	ACCAATTCTCTTGGGAGAGCAGATAAAGAGATGAGGCTAACGGATGGTGAAGACAAATTCG	
61	S G R V E V K V Q E E W G T V C N N G W	
181	TCCGGGAGAGTGGAAAGTCCAGGAGGAGTGGGGAACGGTGTGTAATAATGGCTGG	

SEQUÊNCIA		ID NO
81	G M D E V S V I C R Q L G C P T A I K A	
241	GGCATGGATGAAGTCTCTGTGATTTCAGGCAGCTGGGATGTCCCACTGCTATCAAAGCC	
101	A G W A N S R A G S G R I W M D H V S C	
301	GCTGGATGGGCCAATTCCAGGGCAGGCTCTGGACGAATCTGGATGGATCATGTTCTTGT	
121	R G N E S A L W D C K H D G W G K H N C	
361	CGAGGGAATGAATCTGCTCTCTGGGACTGCAACATGATGGATGGGGAAAGCACAACTGC	
141	S H Q Q D A G V T C S D G S S L E M R L	
421	AGTCATCAACAGGATGCTGGAGTAACCTGTTTCAGATGGATCCAGTTTGGAGATGAGGTTG	
161	M N G G N Q C S G R I E V K F Q G Q W G	
481	ATGAACGCGGAAACCAAGTGTCTGGCAGAATAGAAGTCAAGTCCAGGGACAGTGGGGA	
181	T V C D D N F N I D H A S V V C K Q L E	
541	ACAGTGTGTGATGACAACTTCAACATAGATCATGCTTCTGTGGTTTGTAAACAGCTCGAA	
201	C G S A V S F S G S A N F G E G S G P I	
601	TGTGGAAGTGTCTGCTAGTTTCTCTGGTTCAGCTAATTTTGGAGAAGGTTCTGGGCCAATC	
221	W F D D L V C S G N E S A L W N C K H E	
661	TGTTTTGATGATCTTGTGTGCACTGGAATGAGTCAGCTCTCTGGAACGCAAGCATGAA	
241	G W G K H N C D H A E D V G V I C L D G	
721	GGATGGGGAAAGCATAACTGTGATCACGCTGAGGATGTTGGAGTGATTTGCTTGGATGGA	
261	A D L S L R L V D G V T E C S G R L E V	
781	GCAGATCTGAGCCTGAGACTGGTAGATGCACTGAATGTTTCAGGAAGATTAGAAGTA	
281	K F Q G E W G T V C D D G W D S N D A A	
841	AAATTCGAAGGGGAATGGGGCAGTGTGTGATGATGGCTGGGATAGTAATGATGCTGCT	
301	V V C K Q L G C P T A V T A I G R V N A	
901	GTGGTATGTAAACAACGGGATGCCCACTGCTGTACCGCCATTTGGTCGAGTTAACGCC	
321	S E G S G H I W L D N L S C Q G D E S A	
961	AGTAGGGGAAGTGGACACATTTGGCTTGACAATCTTCTGCAAGGAGACGAATCTGCT	
341	L W Q C R H H E W G K H Y C N H N E D A	
1021	CTCTGGCAGTGTAGACACCATGAATGGGGAAAGCATTATTGCAATCATATGAAGATGCT	
361	G V T C S D G S D L E L R L V G G G S R	
1081	GGTGTGACATTTCTGATGGATCAGACCTGGAGCTGAGACTTGTGCGTGGAGGACGCCGC	
381	C A G T V E V E I Q K L L G K V C D R G	
1141	TGTGCTGGGACAGTGGAGGTTGAAATTCAGAACTGCTAGGGAAAGTATGTGATAGAGGC	
401	W G L K E A D V V C K Q L G C G S A L K	
1201	TGGGACTGAAAGAAGCCGATGTGGTTTGCAAGCAGTTGGGATGTGGATCTGCTCTCAA	
421	T S Y Q R Y S K V K A T N T W L F L S R	
1261	ACGTCCATCAGCGTTATTCCAAAGTTAAGGCAACAAACACATGGCTGTTTTTAAGCCGC	
441	C S G N E T S L W D C K N W Q W G G L S	
1321	TGTAGTGGCAATGAAACTTCCCTTTGGGACTGCAAGAACTGGCAGTGGGGTGGACTGAGC	
461	C D H Y E E A K V T C S A H R E P R L V	
1381	TGTGATCACTATGAAGAAGCTAAAGTTACCTGCTCAGCCACAGGGAACCCAGACTAGTT	
481	G G D I P C S G R V E V K H G D T W G T	
1441	GGAGGAGATATCCCTGCTCTGGTCTGTGAGTGAACATGGTGACACATGGGGCACC	
501	V C D S D F S L E A A S V L C R E L Q C	
1501	GTCTGTGATCCGACTTCTCTTTGGAAGCTGCCAGTGTGCTGTGCAGAGATTACAGTGT	
521	G T V I S I L G G A H F G E G N G Q I W	
1561	GGCAGCTCATCTCCATCCTAGGGGAGCTCAGTTTGGAGAAGGAAATGGACAGATCTGG	
541	A E E F Q C E G Q E S H L S L C S V A S	
1621	GCTGAAGAATTCCAGTGTGAGGGGAGGAGTCCCATCTTCACTCTGTTCAGTAGCCTCT	
561	R P D G T C S H S R D V G V V C S R Y T	
1681	CGCCAGATGGGACCTGTAGCCACAGCAGGGATGTTGGAGTCGTCTGCTCAAGATACAG	
581	E I R L V N G Q S P C E G R V E L K I L	
1741	GAAATCCGCTTGGTGAATGGCCAGTCCCGTGTGAAGGAAGAGTCAAGCTCAAGATACCT	
601	G N W G S L C N S H W D I E D A H V F C	
1801	GGGAACCTGGGATCCCTCTGCAACTCTCACTGGGACATAGAAGATGCCATGTTTCTGT	
621	Q Q L K C G V A L S I P G G A H F G K G	
1861	CAGCAGCTCAAAATGTGGAGTTGCCCTTTCTATTCGGGAGGAGCACATTTTGGGAAAGGA	
641	S G Q I W R H M F H C T G T E Q H M G D	
1921	AGTGGTCAAGATCTGGAGGCACATGTTTCACTGCACTGGGACTGAGCAGACATGGGAGAT	
661	C P V T A L G A T L C S A G Q V A S V I	
1981	TGCCCTGTAACCTGCTCTGGGCGGACGCTGTGTCTGTGGGCAAGTGGCCTCTGTAATC	
681	C S G N Q S Q T L S P C N S T S L D P T	
2041	TGCTCAGGAAATCAGAGCCAGACGCTATCCCATGCAATTCAACATCTCTGACCCCAACA	
701	R S T T S E E S A V A C I A S G Q L R L	
2101	AGATCTACCCTTCGGAAGAAAGTGTGTTGCTGTGATTCGAGTGGGCAACTTCGCCTG	
721	V N G G G R C A G R I E V Y H E G S W G	
2161	GTAATGGAGGCGGTGCTGTGCTGGGAGAATAGAGGTCTACCATGAGGGCTCCTGGGGC	
741	T I C D D S W D L S D A H V V C R Q L G	
2221	ACCATCTGTGATGACAGCTGGGACCTGAGTGATCCCATGTGGTGTGCAGACAGCTGGGC	
761	C G V A I N A T G S A H F G E G T G P I	
2281	TGTGGAGTGGCCATTATGCCACTGGCTCTGCTCATTTTGGGGAGGAAACAGGGCCCATC	
781	W L D E V N C N G K E S H I W Q C R S H	
2341	TGGCTGGACGAGGTGAATGTAATGGAAAGGAATCTCATATCTGGCAATGCCGCTCACAC	
801	G W G Q H N C R H K E D A G V I C S E F	
2401	GGCTGGGGGCAACACAACGCAGACATAAGGAGGATGCAGGAGTTATCTGCTCAGAGTTC	
821	M S L R L I D E T S R D I C A G R L E V	
2461	ATGTCTCTCAGACTGATTGATGAAACAGCAGAGACATCTGTGAGGGCGTCTTGAAGTT	
841	F Y N G A W G S V G K S N M S A T T V E	
2521	TTTACAAATGGAGCTTGGGGCAGCGTTGGCAAGAGTAATATGTCTGCAACCACTGTGGAG	
861	V V C R Q L G C A D K G S I N P A S S D	
2581	GTGGTATGCAGGCAACTGGGTTGTGCAGACAAGGGAGCATCAACCCTGCATCTTCAGAC	
881	K P M S R H M W V D N V Q C P K G P D T	
2641	AAGCCCATGTCCAGGCACATGTGGGTGGACAATGTCCAGTGTCCAAAAGGACCTGACACC	
901	L W Q C P S P W K Q R V A S S S E T	
2701	TTATGGCAGTGCCCATCTTCTCCATGGAACAGAGAGTGGCCAGTTCTTCAGAGGAGACC	

SEQUÊNCIA		ID NO
921	W I T C A N K I R L Q E G T S N C S G R	
2761	TGGATCACATGTGCCAACAAGATAAGACTTCAAGAAGGAACCTCTAATTGTTCTGGACGT	
941	V E L W H G G S W G T V C D D S W D L E	
2821	GTGGAGCTCTGGCACGGAGGTTCTGGGGGACAGTGTGCGATGACTCTGGGACCTTGAA	
961	D A Q V V C R Q L G C G P A L E A L K E	
2881	GATGCACAAGTGGTGTGTCGACAGCTGGGCTGTGGCCAGCATTAGAAGCACTAAAAAGAG	
981	A A F G Q G T G P I W L N D V K C K G N	
2941	GCAGCATTTGGTCAGGGGACTGGGCCTATATGGCTCAATGACGTGAAGTGCAAAGGGAAT	
1001	E S S L W D C P A R P W G H S D C G H K	
3001	GAGTCTTCCTTGTGGGATTGTCTGTAGACCCTGGGGGACAGTGTGCGCCACAAG	
1021	E D A A V R C S E I A M A Q R S S N P R	
3061	GAAGATGCTGCTGTGAGGTGCTCAGAAATGCAATGGCCCAAAGATCATCAATCCTAGA	
1041	G H S S L V A L G I F G V I L L A F L I	
3121	GGTCACTCATCCCTTGTTCATTTGGGATCTTTGGTGTCTCTTCTGGCCTTTCTCATC	
1061	A L L L W T Q R R R Q Q Q R L T V S L R	
3181	GCTCTCTCTTGTGGACTCAAAGGCGAAGACAGCAACAGCGGCTTACAGTTTCCTTGAGA	
1081	G E N S V H Q I Q Y R E M N S S L K A D	
3241	GGAGAGAATTCTGTCCACCAAAATCAATACCGGGAATGAATCTCTCCCTGAAAGCAGAT	
1101	D L D V L T S S E Y P N E S D D F N D A	
3301	GATCTGGACGTGCTGACTTCCTCAGAATATCCCAATGAGTCAGATGATTTAATGATGCT	
1121	G L I S V S K S L P I S G	
3361	GGGCTAATTTCTGTGTCTAAATCTCTTCCTATTCTGGA	
1	MSKLRMVPFH NSGSADFRRC FALLCPSAVA VVSILSTCLM TNSLGRADKE MRLTDGEDNC	SEQ ID NO:48
61	SGRVEVKVQE EWGTVCNNGW GMDEVSVICR QLGCPATAKA AGWANSRAGS GRIWMDHVSC	
121	RGNESALWDC KHDGWGKHNC SHQQDAGVTC SDGSSLEMRL MNGGNQCSGR IEVKFQGWG	
181	TVCDNDFNID HASVVCQLE CGSAVSFSGS ANFEGSGPI WFDDLVCNGN ESALWNCKHE	
241	GWGKHNCDA EDVGVICLDG ADLSLRLVDG VTECSGRLEV KFQGEWGTVC DDGWDSNDAA	
301	VVCKQLGCPT AVTAIGRVNA SEGSGHIWLD NLSCQGDSEA LWQCRHHEWG KHYCNHNEDA	
361	GVTCSGSDL ELRLVGGGSR CAGTVEVEIQ KLLGKVCDRG WGLKEADVVC KQLGCGSALK	
421	TSYQRYSKVK ATNTWFLSLR CSGNETSLWD CKNWQWGLS CDHYEEAKVT CSAHREPRLV	
481	GGDIPCSGRV EVKHGDTWGT VCDSDFSLEA ASVLCRELQC GTVISILGGA HFEGNGQIW	
541	AEFQCEGQE SHLSLCSVAS RPDGTCSSHR DVGVCSSRYT EIRLVNGQSP CEGRVELKIL	
601	GNWGSCLNSH WDIEDAHVFC QQLKCGVALS IPGGAHFGKG SGQIWRHMFH CTGTEQHMGD	
661	CPVTALGATL CSAGQVASVI CSGNQSQTLS PCNSTSLDPT RSTTSEESAV ACIASGQLRL	
721	VNGGGRACGR IEVYHEGSGW TICDSDWDLA DAHVVCRLG CGVAINATGS AHFEGGTGPI	
781	WLDEVNCGK ESHIWQCRSH GWGQHNCRHK EDAGVICSEF MSLRLIDETS RDICAGRLEV	
841	FYNGAWGSVG KSNMSATTVE VVCRQLGCAD KGSINPASS KPMRHMWVD NVQCPKGPDT	
901	LWQCPSSPWK QRVASSSEET WITCANKIRL QEGTSNCSGR VELWHGGSWG TVCDDSWDLE	
961	DAQVVCRLG CGPALEALKE AAFGQGTGPI WLNDVKCKGN ESSLWDPCPAR PWGHSDCGHK	
1021	EDAAVRCSEI AMAQRSSNPR GHSSLVALGI FGVILLAFI ALLLWTQRRR QQQLRTVSLR	
1081	GENSVHQIQY REMNSSLKAD DLDVLTSSSEY PNESDDFNDA GLISVSKSLP ISG	

Exemplo 11. Várias linhagens de células são tornadas permissivas à infecção pelo PRRSV Norte-americano após a transfecção transitória com pCMV-susCD163v1

- Rins de suínos (PK032495), testículo de suínos da Norden Labs (NLST-1), rin de caninos da Norden Labs (NLDK-1) foram obtidos na Pfizer Inc. e foram desenvolvidos a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura consistindo em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. As linhagens de células de rim de Hamster Bebê (BHK21), rim de felinos da Norden Labs (NLFK-1) e pulmões de coelho (RL) foram obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultivo consistindo em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio,

2 mM de L-glutamina e antibióticos. As células Vero foram obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultivo consistindo em Meio Essencial Mínimo Alfa (MEM, Pfizer Inc. formulação) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina e Gentamicina a 20 microgramas por mL. As cavidades de cultura de células (35 mm) contendo aproximadamente 1×10^6 células foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade do plasmídeo pCMV-susCD163v1, em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante. A linhagem de células RL foi transfectada com 1,0 micrograma por cavidade do plasmídeo pCMV-susCD163v1. Um membro da biblioteca de cDNA de células PAM sem um inserto, denominado de pPAMB (essencialmente e vetor plasmideal pSport vazio), foi utilizado como um plasmídeo de controle negativo. 24 horas após a transfecção, as cavidades foram aspiradas e lavadas duas vezes com DMEM/5% de FBS seguido pela infecção com o isolado P129 de PRRSV Norte-americano. Foi permitido que o vírus fosse adsorvido em 0,5 mL de meio de cultura durante um mínimo de duas horas, após as quais mais meio foi adicionado até um volume final de 2,0 mL e incubado durante a noite. O vírus foi então removido, as cavidades foram lavadas duas vezes com meio de cultura e meio de cultura fresco foi adicionado (2,0 mL por cavidade). Uma amostra do tempo zero do fluido de cultura foi tirada imediatamente a fim de determinar o nível de fundo do vírus infeccioso do inóculo. Em um mínimo de 48 horas após a infecção, as culturas foram selecionadas em relação à permissividade através da remoção dos fluidos de cultura a fim de analisar o vírus viável e as células permissivas na monocamada foram detectadas através do ensaio com anticorpo fluorescente (FA). O FA foi completado através da fixação da monocamada com 80% de acetona e corado com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc), que é específico para a proteína de nucleocapsídeo de PRRSV. O vírus viável foi titulado através da inoculação de diluições dos fluidos de cultura nas células MARC-145. A Tabela 5 mostra os resultados da infecção viral por FA e a presença da progênie viral para cada

linhagem de células testada.

- A falha em detectar a progênie viral partindo de algumas linhagens de células pode ser o resultado do baixo título de vírus nos fluidos de cultura de célula, abaixo do limite de detecção do ensaio. A permissividade das células Vero à infecção pelo PRRSV foi aumentada através da expressão de susCD163v1. Comparada com a medida no tempo zero do vírus de fundo, havia um aumento de quase dois logs nos títulos virais nas células Vero transfectadas com pCMV-susCD163v1, enquanto havia menos de um log no aumento do título nas células transfectadas com o plasmídeo de controle negativo pPAMB. Todas as linhagens de células exceto NLDK-1 eram positivas através do FA para a permissividade à infecção pelo isolado P129 de PRRSV Norte-americano após a transfecção com pCMV-susCD163v1.

Tabela 5

Seleção de várias linhagens de células em relação à permissividade ao isolado P129 de PRRSV NA após a transfecção transitória com pCMV-susCD163v1 ou pPAMB				
Linhagem de células transfectada	Ensaio com Anticorpo Fluorescente		Progênie viral produzida	
	pCMV-susCD163v1	pPAMB	pCMV-susCD163v1	pPAMB
BHK21	+++	-	+++	-
PK032495	+	-	+	-
NKFK-1	+	-	+	-
NLST-1	+	-	-	-
NLDK-1	-	-	NT	NT
RL	+	-	-	-
Vero	++	+	++	+

+++ = Altamente positiva

- 15 ++ = Moderadamente positiva

+ = Ligeiramente positiva

- = Não detectado

NT = Não testado

- 20 Exemplo 12. Células BHK21 são tornadas permissivas à infecção pelo PRRSV Europeu após a transfecção transitória com pCMV-susCD163v1

A linhagem de células de rim de Hamster Bebê (BHK21) foi obtida na Pfizer Inc. e cultivada a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura consistindo em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. As cavidades de cultura de células (35 mm) contendo aproximadamente 1×10^6 células foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade do plasmídeo pCMV-susCD163v1, em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante. 24 horas após a transfecção, as cavidades foram aspiradas e lavadas duas vezes com DMEM/5% de FBS seguido pela infecção com o isolado 96V198 de PRRSV Europeu. Foi permitido que o vírus fosse adsorvido durante um mínimo de 2 horas. O vírus foi então removido, as cavidades foram lavadas duas vezes com meio de cultura e foi adicionado meio fresco (2.0 mL por cavidade). Uma amostra do fluido de cultura no tempo zero foi tirada imediatamente a fim de determinar o nível de fundo do vírus infeccioso proveniente do inóculo. Em um mínimo de 48 horas após a infecção, as culturas foram selecionadas em relação à permissividade através da remoção de fluidos da cultura a fim de analisar o vírus viável e as células permissivas na monocamada foram detectadas através do ensaio com anticorpo fluorescente (FA). O FA foi completado através da fixação da monocamada com 80% de acetona e corado com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc), que é específico para a proteína de nucleocapsídeo do PRRSV. O vírus viável foi titulado através da inoculação de diluições dos fluidos de cultura nas células MARC-145. Como um resultado da transfecção transitória de BKH21 com pCMV-susCD163v1, as células foram tornadas permissivas à infecção pelo isolado 96V198 do PRRSV Europeu e produziram progênie viral.

Exemplo 13: Genes CD163 de várias espécies de animais tornam as células BHK21 permissivas à infecção pelo vírus PRRS

As células BHK21 desenvolvidas em DMEM (Invitrogen número de catálogo 11965) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 1 mM de

- piruvato de sódio e antibióticos, foram utilizadas nos experimentos de transfecção transitória. Antes da transfecção as células foram lavadas uma vez com OptiMEM (Invitrogen) sem soro ou outros aditivos. A Lipofectamina 2000 (Invitrogen) foi utilizada em todos os experimentos de transfecção de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A mistura de transfecção consistia em 10 microlitros de Lipofectamina 2000 e 2-3 microgramas de DNA por cavidade de 35 mm. Após a incubação durante a noite, o meio de transfecção foi removido e as células foram infectadas com o isolado P129 de PRRSV. Foi permitido que a infecção continuasse durante 24-48 horas, quando as células foram fixadas com 80% de acetona e coradas com o anti-corpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technology Inc., Brookings, SD). A coloração da proteína do nucleocapsídeo foi visualizada sob um microscópio fluorescente.

- Tabela 6. Transfecção transitória de células BHK21 com vários genes CD163 as tornam permissivas à infecção pelo vírus PRRS

Tabela 6

Estrutura do plasmídeo	Gene CD163	Infecção pelo PRRSV (FA)
pCMV-Script	Swine CD163v1	+++
pRSV-Script	Swine CD163v1	+++
pcDNA3.1D	Swine CD163v2	++
pcDNA3.1D	CD163v2 humano	++
pcDNA3.1D	CD163v3 de camundongo	+
pcDNA3.1D	CD163v2 de macaco verde africano (células MARC-145)	+++
pcDNA3.1D	CD163v7 de células Vero	+++
pcDNA3.1D	CD163v2 de células DH82	+++

+++ = Altamente positiva

++ = Moderadamente positiva

+ = Ligeiramente positiva

Exemplo 14. Produção de linhagens de células estáveis BHK21 permissivas ao PRRSV utilizando pCMV-susCD163v1

As células BHK-21 foram desenvolvidas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 mM de piruvato de sódio e antibióticos. Para a transfecção, as células foram
5 semeadas a aproximadamente 90% de confluência em placas de 6 cavidades e incubadas durante a noite a 37°C em 5% de CO₂. As células foram transfectadas com o DNA de pCMV-susCD163v1 utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Um dia após a
10 transfecção, as células foram tratadas com tripsina e ressemeadas em placas de 96 cavidades em uma diluição em série. Para selecionar transfectantes estáveis, o meio foi suplementado com 1 mg/mL Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) deste ponto em diante. O meio foi trocado a cada 3-5 dias. As placas foram cultivadas até as cavida-
15 des com colônias derivadas de células isoladas atingirem confluência, em cujo ponto as placas foram tratadas com tripsina e semeadas em placas de 96 cavidades em duplicata. Uma das placas de 96 cavidades em duplicata foi infectada com o isolado P129 de PRRSV e os clones permissivos à infecção foram identificados através da coloração com o anticorpo monoclonal
20 SDOW17 conjugado com FITC. Os clones positivos foram então expandidos partindo da segunda placa da duplicata. Para garantir a homogeneidade, as culturas positivas foram clonadas de células isoladas através da diluição limitante. A cada clonagem, os subclones que exibiam crescimento robusto e alta permissividade ao PRRSV foram escolhidos para expansão. Três clones
25 denominados BHK/CMV/v1 Nº 3, BHK/CMV/v1 Nº 5 e BHK/CMV/v1 Nº 12 (Figura 6) foram selecionados. Estas linhagens de células mativeram o fenótipo permissivo ao longo de 20 passagens.

Exemplo 15. Produção de linhagens de células estáveis BHK21 permissivas ao PRRSV utilizando pRSV-susCD163v1

30 As células BHK-21 foram cultivadas como descrito no Exemplo 14. As células BHK-21 foram transfectadas com pRSVsusCD163v1 utilizando a Lipofectamina 2000 como descrito no Exemplo 14. A clonagem de célu-

las transfectadas e a seleção em relação aos clones permissivos foram realizadas essencialmente como descrito no Exemplo 14. Partindo da clonagem original, 3 clones de células isoladas foram identificados como permissivos e foram subsequenteiramente reclonados duas ou mais vezes para garantir a

5 homogeneidade e para tentar isolar subclones de maior permissividade (ver a Figura 7). As linhagens de células resultantes foram chamadas de BHK/RSV/v1, Nº 2, Nº 3 e Nº 4. Todos estes clones mantiveram o fenótipo permissivo ao longo da passagem mais alta testada (passagem 11 para o clone Nº 2, passagem 7 para o clone Nº 3 e passagem 5 para o clone Nº

10 4).

Exemplo 16. Produção de linhagens de células estáveis renais de felinos permissivas ao PRRSV utilizando pCMV-susCD163v1

As células parentais de rim de Felinos da Norden Labs (NLFK) foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (Invitrogen número de catálogo 11965-092) suplementado

15 com 10% de soro fetal bovino, 1 mM de piruvato de sódio e antibióticos. Várias cavidades de 35 mm contendo aproximadamente 2×10^6 células cada foram transfectadas com 4 microgramas por cavidade de pCMV-susCD163v1, em OptiMEM, utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante.

20 Após a incubação durante a noite, as células foram removidas do substrato utilizando Accutase (Innovative Cell Technologies, número de catálogo AT104) diluídas em meio e semeadas nas três placas de 96 cavidades em três densidades (aproximadamente 2×10^2 , 2×10^3 e 2×10^4 células por ca-

25 vidade). Foi permitido que as células assentassem durante a noite a 37 graus C antes do início da seleção de transformantes estáveis. Na manhã seguinte, o meio foi substituído por 100 microlitros/cavidade de meio fresco contendo 500 microgramas/mL de Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) para selecionar células expressando o gene

30 de resistência à neomicina. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias para manter a potência da Geneticina. Após 19 dias de seleção, a placa de 96 cavidades com a densidade celular inicial mais baixa (aproximadamente 200 célu-

las/cavidade) forneceu 70 cavidades vazias e 26 cavidades com uma ou mais colônias de células resistentes a G418 (o número calculado de células resistentes/cavidade é de 0,3, utilizando a distribuição de Poisson). Estas 26 cavidades foram separadas em cavidades em duplicata e foi permitido que
 5 assentassem durante a noite. Um conjunto de cavidades foi infectado com o isolado P129 de PRRSV, incubado durante 24 horas, então fixado com 80% de acetona e corado com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc), que é específico para o nucleocapsídeo de PRRSV. Dos 26 clones, 8 continham algumas células que foram infectadas
 10 pelo PRRSV. Um destes, denominado de "NLFK-CMV-susCD163v1-G4", era claramente mais permissivo que os outros com quase 100% das células com coloração positiva em relação ao antígeno viral.

Na passagem de célula número 5, havia alguma evidência de heterogeneidade fenotípica na linhagem de células NLFK-CMV-susCD163v1-G4. Portanto, as células foram clonadas de células isoladas
 15 através de diluição limitante em meio contendo G418, começando com estoques congelados da passagem 4 de NLFK-CMV-susCD163v1-G4. Doze tais clones ("A" – "L") foram expandidos para o estudo. Destes, os clones NLFK-CMV-susCD163v1-G4F e NLFK-CMV-susCD163v1-G4L eram notáveis em
 20 relação a sua capacidade de formar placas distintas (áreas localizadas de CPE) quando infectados com o isolado P129 de PRRSV (ver a Figura 8).

Exemplo 17. Produção de linhagens de células estáveis renais de felinos permissivas ao PRRSV utilizando pRSV-susCD163v1

As células de rim de Felinos da Norden Labs (NLFK) foram desenvolvidas a 37°C e 5% de CO₂ em Meio Essencial Mínimo Alfa (Invitrogen
 25 número de catálogo 12571-071) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. As células NLFK foram semeadas em placas de 6 cavidades a aproximadamente 90% de confluência e foi permitido que se aderissem durante a noite. As células foram então transfectadas com o plasmídeo pRSV-susCD163v1 utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Após 24 horas, as células foram clonadas como descrito no Exemplo 14. A seleção em relação a clones de células permissivas
 30

ao PRRSV foi realizada como descrito no Exemplo 14. Quatro clones foram selecionados partindo da seleção e foram clonados de células isoladas através da diluição limitante duas ou mais vezes. Quatro clones chamados de FK/RSV/v1 Nº 1, FK/RSV/v1 Nº 2, FK/RSV/v1 Nº 3 e FK/RSV/v1 Nº 4 foram selecionados. Estas linhagens de células mativeram o fenótipo permissivo ao PRRSV ao longo de pelo menos 8 passagens (ver a Figura 9).

Exemplo 18. Produção de linhagens de células de rim suínas permissivas ao PRRSV utilizando pCMV-susCD163v1

As células de rim Suínas Parentais (PK032495) foram obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em meio de cultivo consistindo em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. As cavidades de cultura de tecido (35 mm) contendo aproximadamente 1 x 10⁶ células cada foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade do plasmídeo pCMV-susCD163v1, em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação durante a noite, as células foram lavadas com PBS e removidas do substrato utilizando Accutase (Innovative Cells Technologies, número de catálogo AT104) e diluídas em meio de cultura contendo Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) a 1,0 miligrama por mL e semeadas em placas de 96 cavidades em várias densidades para garantir a recuperação de clones de células isoladas após a seleção com Geneticina. Ao longo da seleção com Geneticina, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 até 5 dias. Após a seleção, as cavidades contendo clones de células isoladas foram expandidas em placas de 96 cavidades em duplicata e foi permitido que incubassem até 100% de confluência fosse atingida. Um conjunto de cavidades foi selecionado em relação à permissividade ao PRRSV através da infecção com o isolado P129 de PRRSV durante um mínimo de 48 horas. Foi observado que onze clones eram permissivos ao PRRSV. Um destes, denominado de "PK-CMV-susCD163v1-A10", manteve claramente o fenótipo permissivo após

várias passagens (ver a Figura 10).

Exemplo 19. Produção de linhagens de células estáveis BHK21 permissivas ao PRRSV utilizando pCMVScript-susCD163v2

As células de rim de Hamster Bebê Parentais (BHK21) foram
 5 obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em
 meio de cultura consistindo em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
 (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 10% de
 soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e
 antibióticos. As cavidades de cultura de tecido (35 mm) contendo aproxima-
 10 damente 1 x 10⁶ células cada foram transfectadas com 2 microgramas por
 cavidade de pCMVScript-susCD163v2, em DMEM sem FBS ou antibióticos,
 utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027)
 de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação durante a noi-
 te, as células foram lavadas com PBS e removidas do substrato utilizando
 15 Accutase (Innovative Cells Technologies, número de catálogo AT104) e dilu-
 ídas em meio de cultura contendo Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen
 número de catálogo 10131-027) a 1,0 miligrama por mL e semeadas em pla-
 cas de 96 cavidades em várias densidades para garantir a recuperação de
 clones de células isoladas após a seleção com Geneticina. Ao longo da se-
 20 leção com Geneticina, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 até 5
 dias. Após a seleção, as cavidades contendo os clones de células isoladas
 foram expandidas em placas de 96 cavidades em duplicata e incubadas até
 100% de confluência terem sido atingidos. Um conjunto de cavidades foi se-
 lecionado em relação à permissividade através da infecção com o isolado
 25 P129 de PRRSV e da incubação durante um mínimo de 48 horas. Foi obser-
 vado que três clones eram permissivos ao PRRSV e um destes, denominado
 de "BHK-CMVScript-susCD163v2-A9", foi escolhido para estudo adicional
 (ver a Figura 11).

Exemplo 20. Produção de linhagens de células estáveis BHK-21 permissivas
 30 ao PRRSV utilizando pRSV-susCD163v2

As células BHK-21 foram cultivadas como descrito no Exemplo
 14. As células BHK-21 foram transfectadas com o construto de DNA de

pRSV-susCD163v2 ligado descrita no Exemplo 5 utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A clonagem subsequente e a seleção de linhagens de células permissivas ao PRRSV foram realizadas como descrito no Exemplo 14. De 336 clones de células isoladas
5 selecionados, 129 eram positivos. Vários destes clones de células foram passados até 7 vezes e mantiveram o fenótipo permissivo ao PRRSV (ver a Figura 12). Estas linhagens de células foram chamadas de BHK/RSV/v2, seguidas por um número de clone numérico.

Exemplo 21. Produção de linhagens de células estáveis renais suínas permissivas ao PRRSV utilizando pCMVScript-susCD163v2
10

As células de rim Suínas Parentais (PK032495) foram obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em meio de cultura consistindo em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. As
15 cavidades de cultura de tecido (35 mm) contendo aproximadamente 1×10^6 células cada foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade de pCMVScript-susCD163v2 em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo
20 com as instruções do fabricante. Após a incubação durante a noite, as células foram lavadas com PBS e removidas do substrato utilizando Accutase (Innovative Cells Technologies, número de catálogo AT104) e diluídas em meio de cultivo contendo Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) a 1,0 miligrama por mL e semeadas em placas de 96
25 cavidades em várias densidades para garantir a recuperação de clones de células isoladas após a seleção com Geneticina. Ao longo da seleção com Geneticina, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 até 5 dias. Após a seleção, as cavidades contendo clones de células isoladas foram expandidas em placas de 96 cavidades em duplicata e incubadas até 100% de con-
30 fluência ter sido atingida. Um conjunto de cavidades foi selecionado em relação à permissividade através da infecção com o isolado P129 de PRRSV e da incubação durante um mínimo de 48 horas. Um clone denominado de

"PK-CMVScript-susCD163v2-D1" exibia o fenótipo de permissividade ao PRRSV.

Exemplo 22. Produção de linhagens de células estáveis BHK21 permissivas ao PRRSV utilizando pcDNA3.1D-humCD163v2

5 As células de rim de Hamster Bebê Parentais (BHK21) foram obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em meio de cultura consistindo em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e

10 antibióticos. As cavidades de cultura de tecido (35 mm) contendo aproximadamente 1×10^6 células cada foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade de pcDNA3.1D-humCD163v2, em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação durante a noite,

15 as células foram lavadas com PBS e removidas do substrato utilizando Accutase (Innovative Cells Technologies, número de catálogo AT104) e diluídas em meio de cultura contendo Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) a 1,0 miligrama por mL e semeadas em placas de 96 cavidades em várias densidades para garantir a recuperação de

20 clones de células isoladas após a seleção com Geneticina. Ao longo da seleção com Geneticina, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 até 5 dias. Após a seleção, as cavidades contendo clones de células isoladas foram expandidas em placas de 96 cavidades em duplicata e incubadas até

25 100% de confluência terem sido atingidos. Um conjunto de cavidades foi selecionado em relação à permissividade através da infecção com o isolado P129 de PRRSV, incubado durante um mínimo de 48 horas. Foi observado que sete clones candidatos eram permissivos ao PRRSV. Havia alguma evidência de heterogeneidade fenotípica em cada um dos sete clones candidatos, provavelmente porque não eram clonais. Portanto, os clones candidatos

30 eram clonados de células isoladas através de diluição limitante em meio contendo G418. Um clone de célula isolada com permissividade evidente ao PRRS foi obtido e denominado de BHK-cDNA3.1D-humCD163v2-H9.

Exemplo 23. Produção de linhagens de células estáveis renais de felinos permissivas ao PRRSV utilizando pcDNA3.1D-humCD163v2

As células de rim de Felinos Parentais da Norden Labs Feline Kidney (NLFK) foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em meio de cultura consistindo em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. As cavidades de cultura de tecido (35 mm) contendo aproximadamente 1 x 10⁶ células cada foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade de pcDNA3.1D-humCD163v2 em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação durante a noite, as células foram lavadas com PBS, removidas do substrato utilizando Accutase (Innovative Cells Technologies, número de catálogo AT104), diluídas em meio de cultura contendo Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) a 500 microgramas por mL e semeadas em placas de 96 cavidades em várias densidades para garantir a recuperação de clones de células isoladas após a seleção com Geneticina. Ao longo da seleção com Geneticina, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 até 5 dias. Após a seleção, as cavidades contendo clones de células isoladas foram expandidas em placas de 96 cavidades em duplicata e incubadas até 100% de confluência ter sido atingida. Um conjunto de cavidades foi selecionado em relação à permissividade ao PRRSV através da infecção com o isolado P129 de PRRSV durante um mínimo de 48 horas. Foi observado que cinco clones eram permissivos. Um destes, denominado de "FK-cDNA3.1D-humCD163v2-A6", exibia claramente o fenótipo permissivo (ver a Figura 13).

As células NLFK parentais e um subclone de FK-cDNA3.1D-humCD163v2-A6 foram verificados em relação à expressão de CD163. As células foram fixadas em 80% de acetona e reagidas com anti-CD163 humano de cabra (R&D System a 1:200) durante uma hora após a lavagem com PBS. Para a visualização, a IgG anticabra de burro conjugado com FITC (Biodesign Inc a 1:100) foi utilizada. Nenhuma fluorescência específica

foi detectada nas células NLFK parentais como mostrado na Figura 21A. A maior parte dos subclones FK.A6.A2 exibia boa coloração fluorescente indicando a presença de CD163 (Figura 21B).

Exemplo 24. Produção de linhagens de células estáveis renais suínas permissivas ao PRRSV utilizando pcDNA3.1D-humCD163v2

As células de rim Suínas Parentais (PK032495) foram obtidas na Pfizer Inc. e foram desenvolvidas a 37 graus C e 5% de CO₂ em meio de cultura consistindo em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen número de catálogo 11965) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. As cavidades de cultura de tecido (35 mm) contendo aproximadamente 1 x 10⁶ células cada foram transfectadas com 2 microgramas por cavidade de pcDNA3.1D-humCD163v2, em DMEM sem FBS ou antibióticos, utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen número de catálogo 11668-027) de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação durante a noite, as células foram lavadas com PBS, removidas do substrato utilizando Accutase (Innovative Cells Technologies, número de catálogo AT104), diluídas em meio de cultura contendo Geneticina (sulfato de G418, Invitrogen número de catálogo 10131-027) a 1,0 miligrama por mL e semeadas em placas de 96 cavidades em várias densidades para garantir a recuperação de clones de células isoladas após a seleção com Geneticina. Ao longo da seleção com Geneticina, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 até 5 dias. Após a seleção, as cavidades contendo clones de células isoladas foram expandidas em placas de 96 cavidades em duplicata e incubadas até 100% de confluência terem sido atingidos. Um conjunto de cavidades foi selecionado em relação à permissividade ao PRRSV através da infecção com o isolado P129 de PRRSV durante um mínimo de 48 horas. Foi observado que dois clones eram permissivos. Um destes, denominado de "PK-cDNA3.1D-humCD163v2-B11" exibia claramente o fenótipo permissivo ao PRRSV.

Exemplo 25. Produção de linhagem de células estáveis renais de felinos permissivas ao PRRSV utilizando pRSV-Script MARC CD163v2 ligado

Foi desenvolvido um procedimento que não é baseado na clo-

nagem para gerar quantidades em micrograma de DNA linear adequado para uso na produção de linhagens de células estáveis expressando CD163 partindo de um promotor RSV (Figura 4). Um processo similar foi adaptado para colocar CD163v2 de símio de células MARC-145 atrás do promotor RSV. O procedimento envolve o isolamento e a ligação de dois pedaços de DNA, um contendo o gene da neomicina e o cassete do promotor RSV derivado do pRSV-script e o outro contendo a sequência codificadora de MARC CD163v2 do pCDNA3.1D MARC CD163v2. O plasmídeo de vetor pRSV-Script foi linearizado com *Hind* III e *Kpn* I. O plasmídeo foi primeiramente digerido com *Kpn* I e as pontas foram tornadas cegas com o fragmento de Klenow da DNA polimerase de *E. coli*. Este plasmídeo foi então digerido com *Hind* III imediatamente a jusante do promotor RSV. O clone pCDNA3.1D MARC CD163v2 foi digerido na sequência do vetor a jusante do inserto CD163 com *EcoRV* e *Hind* III a montante de CD163. A sequência codificadora de CD163 foi liberada do vetor. Para a digestão de cada plasmídeo, os fragmentos apropriados foram purificados dos géis de agarose. Uma reação de ligação em grande escala foi realizada como a seguir. Aproximadamente 20 µg de cada fragmento de DNA foram incubados em um volume de 600 µL com 15 unidades de T4 DNA ligase. A reação foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a ligação, um pedaço linear de DNA contendo todos os elementos apropriados foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A análise de digestão com enzima de restrição foi realizada para confirmar a autenticidade de cada fragmento ligado. A ligação dos dois fragmentos de DNA através dos terminais coesivos de *Hind* III resultou na colocação das sequências a 5' do gene MARC CD163 a jusante do promotor RSV, permitindo a expressão direcionada de CD163 em células de mamíferos. Uma vez isolado, o DNA purificado foi utilizado para transfectar linhagens de células de mamíferos selecionadas.

As células de rim de Felinos da Norden Labs (NLFK) foram desenvolvidas a 37° C e 5% de CO₂ em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino e antibióticos. As células NLFK foram semeadas em placas de 6 cavidades a aproximadamente 90% de confluência e foi permitido que ade-

rissem durante a noite. As células foram então transfectadas com o plasmídeo pRSV-MARC CD163v2 ligado utilizando a Lipofectamina 2000 seguindo as instruções do fabricante. Após 24 horas, as células foram clonadas como descrito no Exemplo 12. A seleção em relação a clones de células permissivas ao PRRSV foi realizada como descrito no Exemplo 12. Um clone era positiva em relação à infecção pelo PRRSV e denominada de NLFK-MARC CD163 D4. Este clone D4 manteve o fenótipo permissivo ao PRRSV ao longo de 9 passagens.

5
10 Exemplo 26. Cinética de crescimento do isolado NVSL 94-3 de PRRSV em células BHK-21 e NLFK recombinantes expressando de forma estável susCD163v1 partindo do promotor de CMV.

Foram medidas as quantidades de progênie do vírus produzida pelas células BHK-21 ou NLFK engenheiradas de forma estável para expressar susCD163v1. Quatro linhagens de células expressando
15 susCD163v1, BHK/CMV/susv1 Nº 3, BHK/CMV/susv1 Nº 5, BHK/CMV/susv1 Nº 12 e FK/CMV/susv1 G4 foram semeadas até a subconfluência em placas de 6 cavidades e, após a incubação durante a noite, foram infectadas com o isolado NVSL 94-3 de PRRSV. As células MARC-145 foram incluídas no experimento para comparação. As células foram infecta-
20 das com vírus a uma m.o.i. de aproximadamente 0,1. O vírus foi adsorvido durante 60-90 minutos e foi removido. As células foram lavadas três vezes com PBS para remover o vírus residual. Alíquotas de um mililitro foram coletadas das culturas em intervalos de 12 horas começando imediatamente após a infecção e continuando ao longo de 96 h. O meio de cultura fresca foi
25 adicionado às células em vários pontos de tempo para manter um volume de cultura suficiente para prevenir que a monocamada de células secasse. Os sobrenadantes de cultura foram armazenados a -80º até todas as amostras serem coletadas. A quantidade de PRRSV presente nos sobrenadantes de cultura foi determinada através do ensaio de placas em células MARC-145.
30 A Figura 14 mostra que todas as linhagens de células recombinantes testadas expressando CD163 eram capazes de produzir progênie de PRRSV.

Exemplo 27. Bloqueio da infecção por PRRSV com o anticorpo anti-CD163: Células transfectadas de forma transitória.

As células BHK-21, semeadas em placas de 24 cavidades, foram transfectadas de forma transitória com o plasmídeo pCDNA3.1D-MARC-CD163v2 descrito no exemplo 8, utilizando a Lipofectamina 2000 como descrito no exemplo 14. Após a incubação durante a noite para permitir a expressão de CD163, uma titulação do anticorpo policlonal de cabra específico ao CD163 humano (R&D Systems, cat N° AF1607) em PBS foi adicionada às células em um volume de 100 µL. Como um controle, foram utilizadas quantidades equivalentes de IgG de cabra normal (R&D Systems, cat N° AB-108-C). Após uma incubação de uma hora a 37°C, as monocamadas foram infectadas com aproximadamente 1×10^7 ufp de uma cepa P129 recombinante de PRRSV que expressa GFP. As monocamadas de células, com o anticorpo anti-CD163 e PRRSV, foram incubadas a 37°C durante uma hora em cujo tempo a mistura de inóculo viral/anticorpo foi aspirada, a monocamada de células lavada uma vez com PBS e 1 mL de meio de cultura foi adicionado às cavidades. As células foram incubadas durante 24 horas a 37°C para permitir a expressão de GFP direcionada ao PRRSV. Para a análise, as células foram tratadas com tripsina, ressuspensas em 500 µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo para inumerar as células infectadas por PRRSV através da expressão de GFP. Para a citometria de fluxo, as células BHK-21 não infectadas foram utilizadas para ajustar a linha de base para a detecção da fluorescência e aproximadamente 100.000 células foram analisadas partindo de cada amostra subsequente. Os resultados desta análise, mostrados na Figura 15, mostram que o anticorpo específico a CD163 era capaz de reduzir significativamente as células infectadas quando comparadas às células incubadas com IgG de cabra normal.

Exemplo 28: Bloqueio da infecção por PRRSV através do anticorpo anti-CD163: Células transfectadas de forma estável.

As células NLFK que expressam de forma estável o CD163 humano (FK-cDNA3.1D-humCD163v2-A6), descritas no Exemplo 23, foram semeadas em placas de 24 cavidades. Após permitir a adesão das células

durante a noite, uma titulação de anticorpo policlonal de cabra específico para o CD163 humano (R&D Systems, cat N° AF1607) em PBS foi adicionada às células em um volume de 100 µL. Como um controle, foram utilizadas quantidades equivalentes de IgG de cabra normal (R&D Systems, cat N° AB-108-C). Após uma incubação de uma hora a 37°C, as monocamadas foram infectadas com aproximadamente 1×10^7 ufp de uma cepa P129 recombinante do PRRSV que expressa GFP. As monocamadas de células, com o anticorpo anti-CD163 e o PRRSV, foram incubadas a 37°C durante uma hora em cujo tempo a mistura de inóculo viral/anticorpo foi aspirada, a monocamada de células foi lavada uma vez com PBS e 1 mL de meio de cultura foi adicionado às cavidades. As células foram incubadas durante 24 horas a 37°C para permitir a expressão de GFP direcionada ao PRRSV. Para a análise, as células foram tratadas com tripsina, ressuspensas em 500 µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo para inumerar as células infectadas por PRRSV através da expressão de GFP. Aproximadamente 100.000 células foram analisadas partindo de cada amostra. Os resultados desta análise, mostrados na Figura 16, mostram que o anticorpo específico a CD163 era capaz de reduzir significativamente o número de células infectadas quando comparadas com as células incubadas com IgG de cabra normal.

Exemplo 29. Produção de linhagens de células estáveis renais suínas permissivas ao PRRSV utilizando pRSV-susCD163v2.

As células de rim suínas (PK032495) foram cultivadas como descrito no Exemplo 21. Para a transfecção, as células foram semeadas em uma placa de 24 cavidades a 80% de confluência e foi permitido que se recuperassem durante a noite. A transfecção do DNA de pRSV-susCD163v2 ligado descrito no Exemplo 5 foi realizada utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A clonagem e a seleção subsequentes das células permissivas ao PRRSV foram realizadas essencialmente como descrito no Exemplo 14. A clonagem inicial através da diluição limitante falhou em produzir clones derivados de células isoladas, assim 5 cavidades com células permissivas ao PRRSV foram reclonadas através da

diluição limitante para produzir linhagens de células clonais. 10 clones foram selecionados para estudo adicional e um destes clones, PK-RSVScript-susCD163v2 Nº 9 exibiu a capacidade de sustentar o crescimento focal de PRRSV logo após a infecção (ver a Figura 18).

5 Exemplo 30. Produção de linhagens de células estáveis renais de felinos permissivas ao PRRSV utilizando pRSV-susCD163v2.

As células de rim de felinos NLFK foram cultivadas como descrito no Exemplo 17. Para a transfecção, as células foram semeadas a aproximadamente 80% da densidade máxima em placas de 24 cavidades. Após a
10 incubação durante a noite, as monocamadas foram transfectadas com a ligação derivada de RSV/susCD163v2 (ver o exemplo 5) utilizando a Lipofectamina seguindo as instruções do fabricante. A clonagem das células transfectadas e a seleção de clones de células permissivos ao PRRSV foram realizadas essencialmente como descrito no Exemplo 14. Dos 67 clones de cé-
15 lulas testados em relação à permissividade ao PRRSV, foi observado que 20 eram positivos. Um exemplo da coloração observada é mostrado na Figura 19.

Exemplo 31. Passagem do isolado P201 de PRRSV em células PK-RSVScript-susCD163v2

20 A amplificação de um isolado clínico de PRRSV foi realizada como a seguir. As células de macrófagos alveolares periféricos (PAM) foram semeadas a $5,4 \times 10^6$ células por 10 cm^2 em uma placa de 6 cavidades utilizando meio OptiMEM suplementado com 2% de FBS. Após 6 horas, o meio foi aspirado e uma alíquota de 2 mL de soro coletada de um porco infectado
25 por PRRSV foi adicionada às células. Após uma adsorção de 90 minutos, o inóculo do soro foi removido e substituído por OptiMEM. Aproximadamente 40 minutos após a infecção, o sobrenadante foi coletado e clarificado com uma centrifugação de 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado diretamente para infectar as células PK-RSVScript-susCD163v2 clone Nº 9 utilizando
30 uma adsorção de 6 horas. Após a remoção do inóculo, as células foram realimentadas com D-MEM. O vírus P201 foi passado em série na linhagem de células PK-RSVScript-susCD163v2 Nº 9 utilizando passagens alternadas de

célula infectada e sobrenadante isento de células. Foi observado que para o espalhamento eficiente do vírus, as células deviam ser semeadas a 50-70% de confluência no dia anterior da infecção, utilizando frascos de células que eram mantidos em subconfluência. Para acompanhar a progressão da infecção, cada passagem foi replicada em várias cavidades de células infectadas de forma idêntica e a cada dia uma das cavidades era fixada com acetona e corada com anticorpo monoclonal SDOW17 marcado com FITC. Se uma porcentagem de células infectadas não fosse maior que 50% e uma progressão significativa do desenvolvimento dos focos em relação às observações de dias anteriores não fosse observada, as células em uma cavidade equivalente eram tratadas com tripsina e passadas para várias cavidades novas. Estas passagens de células infectadas estavam tipicamente a uma separação de 1:4 e algumas vezes incluíam a adição de um número equivalente de células provenientes de uma cultura não infectada. Alternativamente se a coloração por SDOW17 revelasse que os focos de células infectadas tinham se espalhado suficientemente para ser responsável por mais de 50% das células totais, o sobrenadante isento de células era coletado e utilizado para infectar várias cavidades de células recém-semeadas (Figura 20). Após 11 passagens, as passagens de células intermediárias não eram necessárias uma vez que o vírus era capaz de crescer até um título suficiente para permitir a passagem do vírus do sobrenadante isento de células consecutiva.

Exemplo 32. Seleção de várias linhagens de células CD163 em relação à permissividade a vários isolados de PRRSV Europeus e Norte-americanos

Várias linhagens de células CD163 transgênicas foram avaliadas em relação à permissividade aos isolados de PRRSV Europeus e Norte-americanos de passagem baixa (ver a Tabela 7). As linhagens de células CD163 transgênicas que são descritas nos exemplos anteriores incluíam NLFK-MARC CD163 D4, PK-RSVScript-susCD163v2 clone Nº 9 e PK-CMV-susCD163v1-A10. Cada linhagem de células CD163 junto com as linhagens de células MARC-145, renais de felinos parentais, linhagens de células de rim suínas parentais (servindo como controles) foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades. O meio de cultura foi removido das

monocamadas e inoculado com 0,1 mL por cavidade de cada isolado de PRRSV. No dia 3 após a infecção, as placas foram fixadas com 80% de acetona e coradas com o anticorpo monoclonal SDOW17 conjugado com FITC (Rural Technologies Inc.) que é específico para o nucleocapsídeo. Os resultados do ensaio com anticorpo fluorescente (FA) estão na Tabela 7.

Tabela 7

Resultados de FA da seleção de várias linhagens de células CD163 em relação à permissividade aos isolados de PRRSV Europeus e Norte Americanos						
Linhagem de células CD163	Isolate de PRRSV ^a					
	EU98 V226	P129	P201	1151	94-3	IND5
NLFK-MARC CD163 D4	++	+	+++	+++	++	++++
PK-RSVScript-susCD163v2clone Nº 9	+	+	++	+	+	++
PK-CMV-susCD163v1-A10	+	+	++	++	++	++
MARC-145	++	+	+++	+	++++	+++
Renais Suínas (parentais)	-	-	-	-	-	-
Renais de Felinos (parentais)	-	-	-	-	-	-

^a Todos os isolados de PRRSV são Norte-americanos exceto o EU98V226 que é um isolado Europeu.

Exemplo 33. Indução com 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) de CD163 torna as células U937 humanas permissivas à infecção pelo PRRSV.

As células U937 humanas obtidas da ATCC (CRL-1593.2) foram propagadas em meio RPMI contendo soro e aditivos de acordo com as especificações da ATCC. Estas células são conhecidas por expressarem CD163 quando ativadas através do tratamento com PMA (Gronlund e outros, 2000). As células U937 foram semeadas em duplicata em cavidades de uma placa de 6 cavidades. Um conjunto de cavidades foi tratado com 100 ng/mL de PMA e o outro conjunto foi deixado sem tratamento. Três dias após o estímulo com PMA, uma cavidade de cada conjunto foi infectada com o isolado P129 de PRRSV. A outra cavidade de cada conjunto foi fixada e corada em relação à expressão de CD163 em um ensaio indireto com anticorpo imuno-fluorescente utilizando anti-CD163 humano de cabra (R&D System) e IgG anticabra de burro conjugada com FITC (BioDesign International).

As células U937 não tratadas continuaram a se propagar até uma alta densidade 3 dias após o plaqueamento inicial. As células U937 tratadas com PMA interromperam a propagação, ficaram maiores e se aderiram à superfície das cavidades de cultura. Uma pequena fração de U937 não tratada era positiva para a coloração de CD163, enquanto quase todas as U937 tratadas com PMA eram positivas para a coloração de CD163. Nas U937 não tratadas não eram observadas células infectadas pelo PR-RSV. Entretanto, centenas de células U937 tratadas com PMA ficavam infectadas pelo PRRSV. Isto demonstra que as células não permissivas podiam ser tornadas permissivas para a infecção pelo PRRSV após a indução química da expressão de CD163.

Características e variações adicionais da invenção serão evidentes para os peritos na técnica partindo da totalidade deste pedido de patente, incluindo a descrição detalhada e é pretendido que todas as tais características sejam aspectos da invenção. Similarmente, as características da invenção descrita aqui podem ser recombinadas em modalidades adicionais que também são pretendidas como aspectos da invenção, independentemente do fato da combinação das características ser especificamente mencionada anteriormente como um aspecto ou uma modalidade da invenção. Ainda, apenas tais limitações que são descritas aqui como críticas para a invenção devem ser vistas como tais; é pretendido que as variações da invenção que não possuem limitações que não foram descritas aqui como críticas sejam aspectos da invenção.

Será evidente que a invenção pode ser praticada de outra maneira que a descrita particularmente nas descrições e nos exemplos anteriores.

Inúmeras modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos ensinamentos anteriores e, portanto, estão dentro do âmbito da invenção.

A descrição inteira de todas as publicações citadas aqui é incorporada aqui como referência até a extensão em que não é incoerente com a descrição contida aqui.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo *in vitro* de facilitação da infecção de uma célula de vertebrado por PRRSV, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de

5 (a) direcionamento da expressão aumentada de um polipeptídeo CD163 pela referida célula vertebrada, em que o referido polipeptídeo CD163 compreende um domínio transmembrana, e em que a referida expressão aumentada é alcançada pela introdução de um ácido nucleico exógeno.

10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a infecção da referida célula com PRRSV.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a produção de uma cultura de PRRSV.

15 4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita célula é de mamífero.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita célula era não permissiva ao PRRSV e é tornada permissiva ao PRRSV através da etapa (a).

20 6. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o PRRSV é o genótipo Europeu.

7. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o PRRSV é do genótipo Norte-americano.

25 8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de produção de uma vacina para PRRSV.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a vacina é morta.

10. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a vacina é viva atenuada.

30 11. Processo para medir a propensão de uma linhagem de células de teste a permitir a infecção pelo PRRSV, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) o fornecimento de uma amostra que contém ácidos nucleicos da linhagem de células de teste;

b) a determinação da quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 ou seu complemento na dita amostra;

5 em que uma maior quantidade de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CD163 relativa a uma amostra de controle derivada de uma linhagem de células de controle conhecida por não sustentar o crescimento do dito PRRSV indica uma propensão da linhagem de células de teste a sustentar a replicação do dito PRRSV.

10 12. Processo para medir a propensão de uma linhagem de células de teste a permitir a infecção pelo PRRSV, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) o fornecimento de uma amostra que contém polipeptídeos da linhagem de células de teste;

15 (b) a determinação da quantidade de polipeptídeo CD163 na dita amostra;

em que uma maior quantidade de um polipeptídeo CD163 relativa a uma amostra de controle derivada de uma linhagem de células de controle conhecida por não sustentar o crescimento do dito PRRSV indica uma propensão da linhagem de células de teste a sustentar a replicação do dito PRRSV.

20

FIG 1

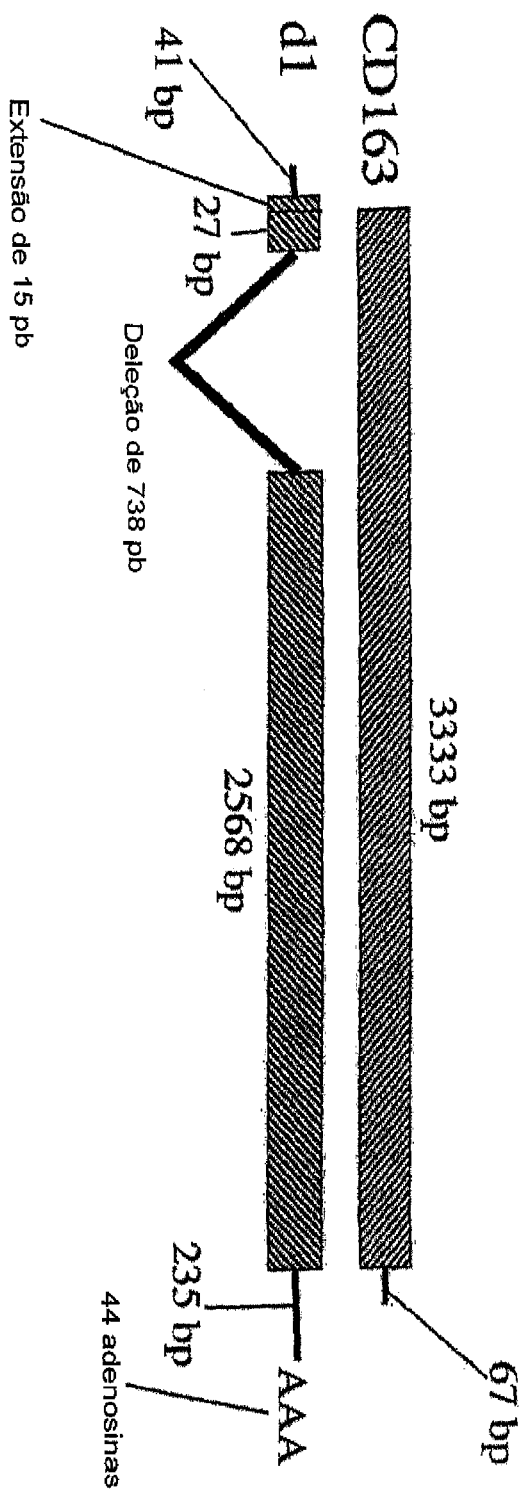


FIG 2A

AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	1 MVLLEDGSGADFRRCSAHLSSFTFAVVAVL ⁶⁰ SA ⁶⁰ CLVTS ⁶⁰ SLGGKDKEL ⁶⁰ LTG ⁶⁰ ENK ⁶⁰ C ⁶⁰ MDKLRAVLH ⁶⁰ ENG ⁶⁰ SAD ⁶⁰
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	61 SGRVEVKVQ ⁶¹ ERMG ⁶¹ TV ⁶¹ CN ⁶¹ GM ⁶¹ DM ⁶¹ DV ⁶¹ SV ⁶¹ CRQ ⁶¹ LGC ⁶¹ PTA ⁶¹ LKA ⁶¹ TGMA ⁶¹ NF ⁶¹ SAG ⁶¹ SR ⁶¹ IM ⁶¹ DH ⁶¹ VS ⁶¹ C ⁶¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	121 RGNESALMDCK ¹²¹ HDG ¹²¹ MG ¹²¹ KH ¹²¹ NC ¹²¹ THQ ¹²¹ ODAG ¹²¹ VT ¹²¹ CS ¹²¹ DG ¹²¹ SD ¹²¹ LE ¹²¹ MR ¹²¹ LV ¹²¹ NG ¹²¹ NR ¹²¹ CL ¹²¹ GR ¹²¹ IE ¹²¹ VF ¹²¹ Q ¹²¹ ER ¹²¹ MG ¹²¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	181 TVCDNPNIN ¹⁸¹ NAS ¹⁸¹ VV ¹⁸¹ CKQ ¹⁸¹ LE ¹⁸¹ CS ¹⁸¹ AV ¹⁸¹ SP ¹⁸¹ SG ¹⁸¹ AN ¹⁸¹ FG ¹⁸¹ BG ¹⁸¹ SD ¹⁸¹ IP ¹⁸¹ FD ¹⁸¹ LV ¹⁸¹ CN ¹⁸¹ GESAL ¹⁸¹ PN ¹⁸¹ CK ¹⁸¹ HE ¹⁸¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	241 GNGKNC ²⁴¹ HD ²⁴¹ HA ²⁴¹ ED ²⁴¹ AG ²⁴¹ VT ²⁴¹ CL ²⁴¹ NG ²⁴¹ AD ²⁴¹ L ²⁴¹ K ²⁴¹ RV ²⁴¹ VD ²⁴¹ GL ²⁴¹ TE ²⁴¹ CS ²⁴¹ GR ²⁴¹ LE ²⁴¹ VF ²⁴¹ Q ²⁴¹ ER ²⁴¹ MG ²⁴¹ FT ²⁴¹ CD ²⁴¹ GM ²⁴¹ SD ²⁴¹ DA ²⁴¹ IKL ²⁴¹ RV ²⁴¹ VD ²⁴¹ GL ²⁴¹ TE ²⁴¹ CS ²⁴¹ GR ²⁴¹ LE ²⁴¹ VF ²⁴¹ Q ²⁴¹ ER ²⁴¹ MG ²⁴¹ FT ²⁴¹ CD ²⁴¹ GM ²⁴¹ SD ²⁴¹ DA ²⁴¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	301 VACKQ ³⁰¹ LGC ³⁰¹ PTA ³⁰¹ VTA ³⁰¹ IG ³⁰¹ RVNA ³⁰¹ SE ³⁰¹ GT ³⁰¹ GH ³⁰¹ W ³⁰¹ LD ³⁰¹ VS ³⁰¹ CH ³⁰¹ GESAL ³⁰¹ MO ³⁰¹ CR ³⁰¹ HH ³⁰¹ EM ³⁰¹ GK ³⁰¹ HY ³⁰¹ CN ³⁰¹ HN ³⁰¹ EDA ³⁰¹ VACKQ ³⁰¹ LGC ³⁰¹ PTA ³⁰¹ VTA ³⁰¹ IG ³⁰¹ RVNA ³⁰¹ SE ³⁰¹ GT ³⁰¹ GH ³⁰¹ W ³⁰¹ LD ³⁰¹ VS ³⁰¹ CH ³⁰¹ GESAL ³⁰¹ MO ³⁰¹ CR ³⁰¹ HH ³⁰¹ EM ³⁰¹ GK ³⁰¹ HY ³⁰¹ CN ³⁰¹ HN ³⁰¹ EDA ³⁰¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	361 GVTCSD ³⁶¹ GS ³⁶¹ DL ³⁶¹ EL ³⁶¹ RL ³⁶¹ KGG ³⁶¹ SH ³⁶¹ CA ³⁶¹ GT ³⁶¹ VE ³⁶¹ EL ³⁶¹ Q ³⁶¹ LV ³⁶¹ GK ³⁶¹ VC ³⁶¹ DR ³⁶¹ SWG ³⁶¹ L ³⁶¹ EA ³⁶¹ DV ³⁶¹ VC ³⁶¹ ROL ³⁶¹ GC ³⁶¹ GS ³⁶¹ AL ³⁶¹ K ³⁶¹ GVTCSD ³⁶¹ GS ³⁶¹ DL ³⁶¹ EL ³⁶¹ RL ³⁶¹ KGG ³⁶¹ SH ³⁶¹ CA ³⁶¹ GT ³⁶¹ VE ³⁶¹ EL ³⁶¹ Q ³⁶¹ LV ³⁶¹ GK ³⁶¹ VC ³⁶¹ DR ³⁶¹ SWG ³⁶¹ L ³⁶¹ EA ³⁶¹ DV ³⁶¹ VC ³⁶¹ ROL ³⁶¹ GC ³⁶¹ GS ³⁶¹ AL ³⁶¹ K ³⁶¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	421 TSYQ ⁴²¹ VYS ⁴²¹ K ⁴²¹ TA ⁴²¹ NT ⁴²¹ WL ⁴²¹ FW ⁴²¹ SS ⁴²¹ CN ⁴²¹ GE ⁴²¹ SL ⁴²¹ MD ⁴²¹ CK ⁴²¹ NW ⁴²¹ Q ⁴²¹ MG ⁴²¹ LS ⁴²¹ CH ⁴²¹ YE ⁴²¹ AK ⁴²¹ IT ⁴²¹ CS ⁴²¹ AH ⁴²¹ RK ⁴²¹ PR ⁴²¹ LV ⁴²¹ TSYQ ⁴²¹ VYS ⁴²¹ K ⁴²¹ TA ⁴²¹ NT ⁴²¹ WL ⁴²¹ FW ⁴²¹ SS ⁴²¹ CN ⁴²¹ GE ⁴²¹ SL ⁴²¹ MD ⁴²¹ CK ⁴²¹ NW ⁴²¹ Q ⁴²¹ MG ⁴²¹ LS ⁴²¹ CH ⁴²¹ YE ⁴²¹ AK ⁴²¹ IT ⁴²¹ CS ⁴²¹ AH ⁴²¹ RK ⁴²¹ PR ⁴²¹ LV ⁴²¹
AJ311716 (Suino) Pfizer_susCD163v1	481 GGD ⁴⁸¹ IPC ⁴⁸¹ SG ⁴⁸¹ RV ⁴⁸¹ Q ⁴⁸¹ HD ⁴⁸¹ TW ⁴⁸¹ GT ⁴⁸¹ VC ⁴⁸¹ DS ⁴⁸¹ FI ⁴⁸¹ EA ⁴⁸¹ SV ⁴⁸¹ LC ⁴⁸¹ REL ⁴⁸¹ Q ⁴⁸¹ CG ⁴⁸¹ TV ⁴⁸¹ SL ⁴⁸¹ GA ⁴⁸¹ HF ⁴⁸¹ GR ⁴⁸¹ GS ⁴⁸¹ GQ ⁴⁸¹ IT ⁴⁸¹ GGD ⁴⁸¹ IPC ⁴⁸¹ SG ⁴⁸¹ RV ⁴⁸¹ Q ⁴⁸¹ HD ⁴⁸¹ TW ⁴⁸¹ GT ⁴⁸¹ VC ⁴⁸¹ DS ⁴⁸¹ FI ⁴⁸¹ EA ⁴⁸¹ SV ⁴⁸¹ LC ⁴⁸¹ REL ⁴⁸¹ Q ⁴⁸¹ CG ⁴⁸¹ TV ⁴⁸¹ SL ⁴⁸¹ GA ⁴⁸¹ HF ⁴⁸¹ GR ⁴⁸¹ GS ⁴⁸¹ GQ ⁴⁸¹ IT ⁴⁸¹

3/24

AJ311716 (Suino)	541
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	601
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	661
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	721
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	781
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	841
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	901
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	961
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	1021
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	1081
Pfizer_susCDI63v1	
AJ311716 (Suino)	1141
Pfizer_susCDI63v1	

FIG 3A

Alinhamento de DNA de Martinez/Needleman-Wünsch
Combinação Máxima: 5; Penalidade de Espaço: 1,10; Penalidade de Comprimento de Penalidade: 0,33

[illegible]

5/24

FIG 3B

[illegible]

RESEARCH

6124

6/24

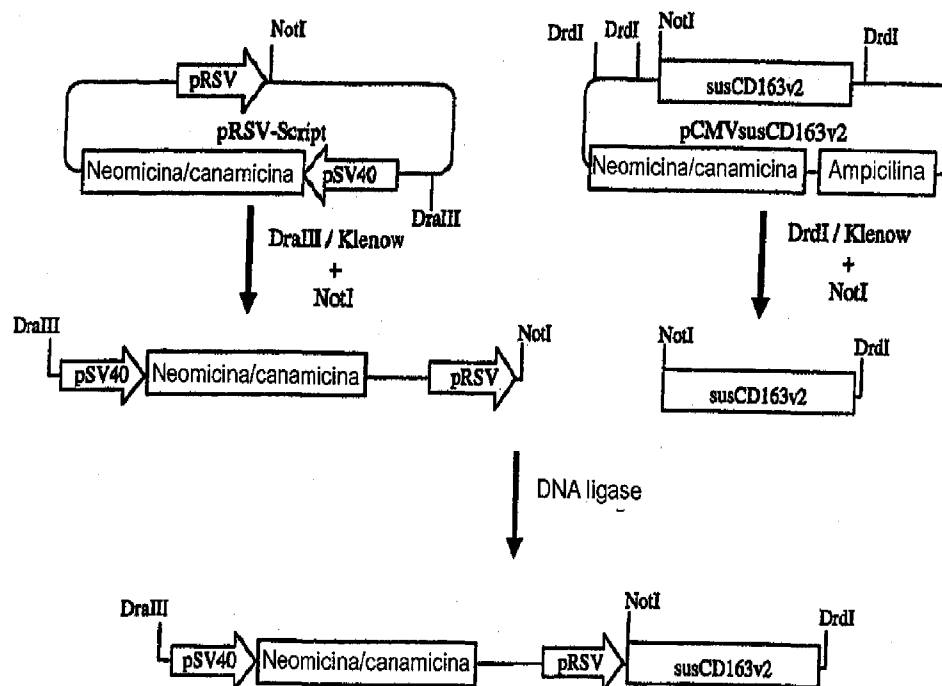
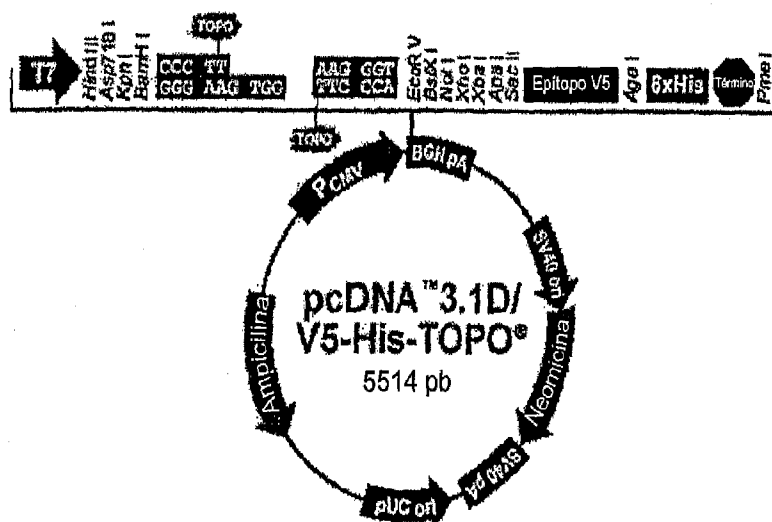


FIG 4



Promotor do CMV: bases 232-819

Promotor T7/sítio de iniciação: bases 853-882

Sítio de reconhecimento 1 de TOPO[®]: bases 930-934

Sequência pendurada (filamento complementar): bases 935-938

Sítio de reconhecimento 2 de TOPO*: **basas 939-943**

Epítopo V5: bases 1011-1052

Marcação de polihistidina (6xHis): bases 1062-1079

Sítio de iniciação inverso de BGH: 1102-1119

Sinal de poliadenilação de BGH: 1108-1332

Promotor inicial e origem de Sy40: 1833-2142

Gene de resistência à neomicina: bases 2217-3011

Sinal de poliadenilação inicial de Sy40: 3189-3319

Origem de pUC: bases 3700-4373 (filamento complementar)

Gene de resistência à ampicilina (*bla*): bases 45185378 (filamento complementar)

Promotor bla: bases 5379-5477 (filamento complementar)

FIG 5

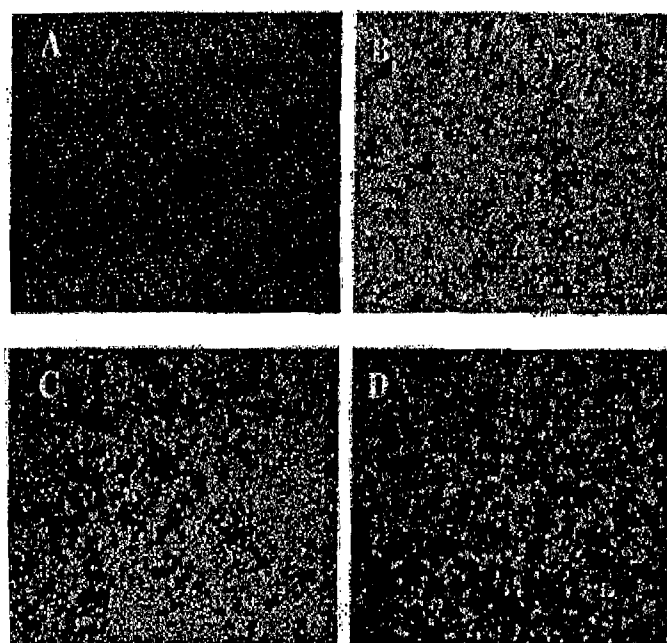


FIG 6

10/24

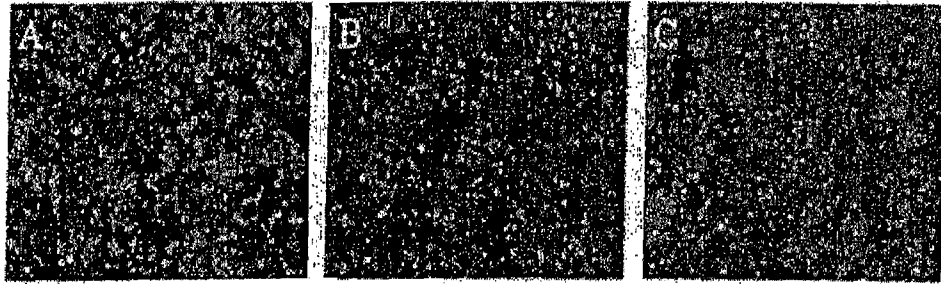


FIG 7

11/24

FIG 8

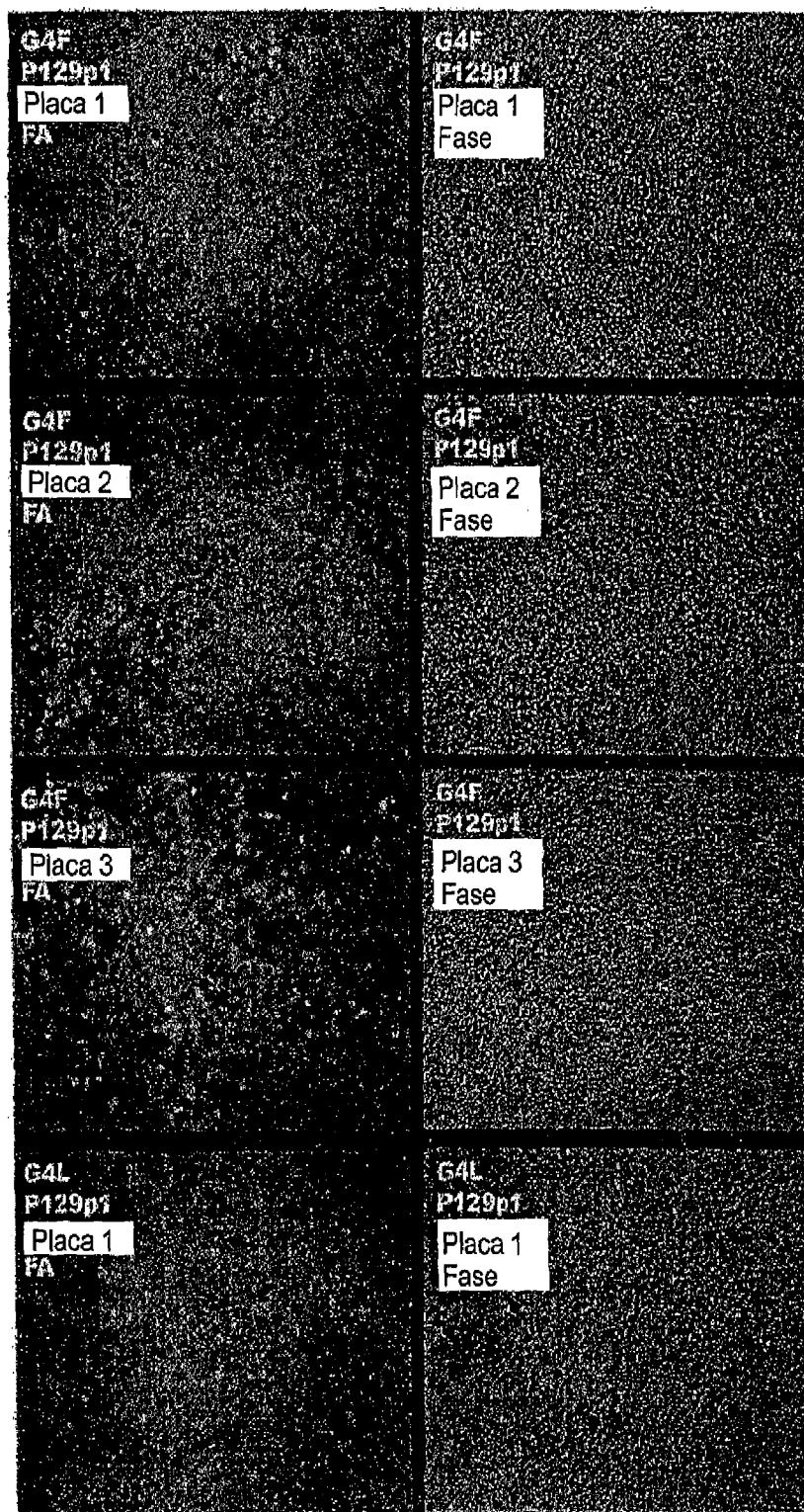


FIG 9

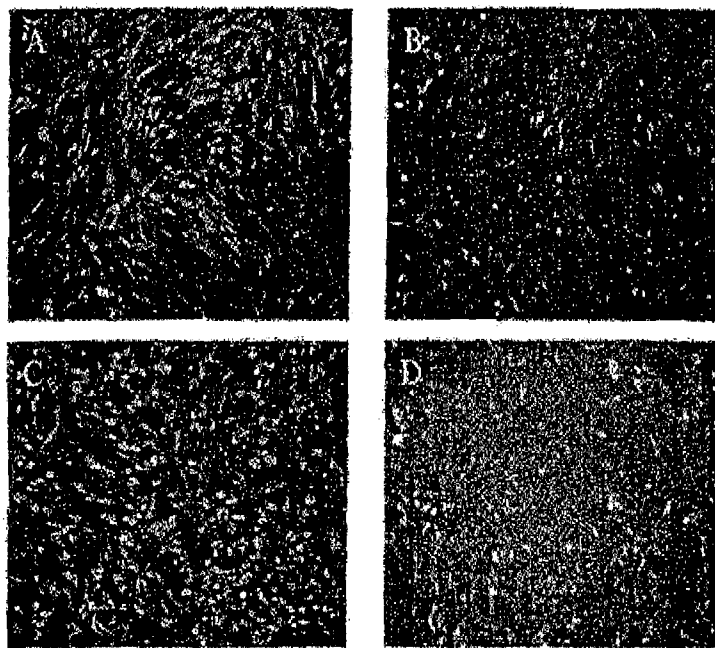


FIG 10

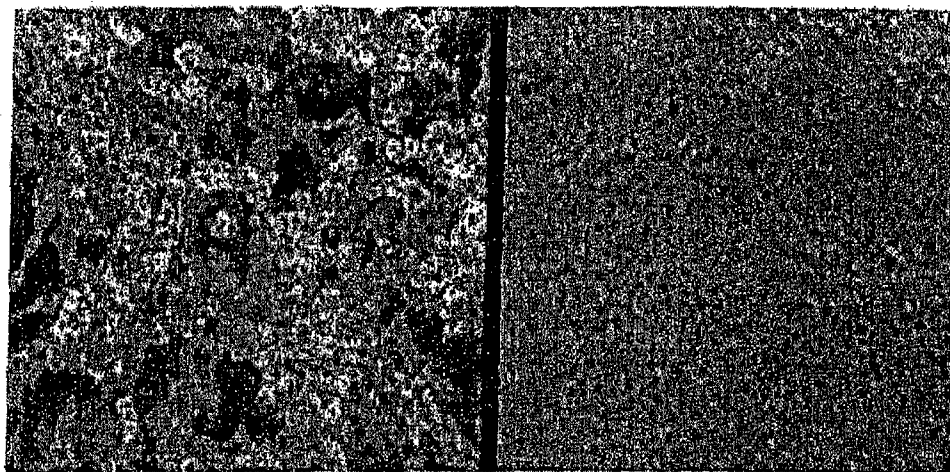


FIG 11

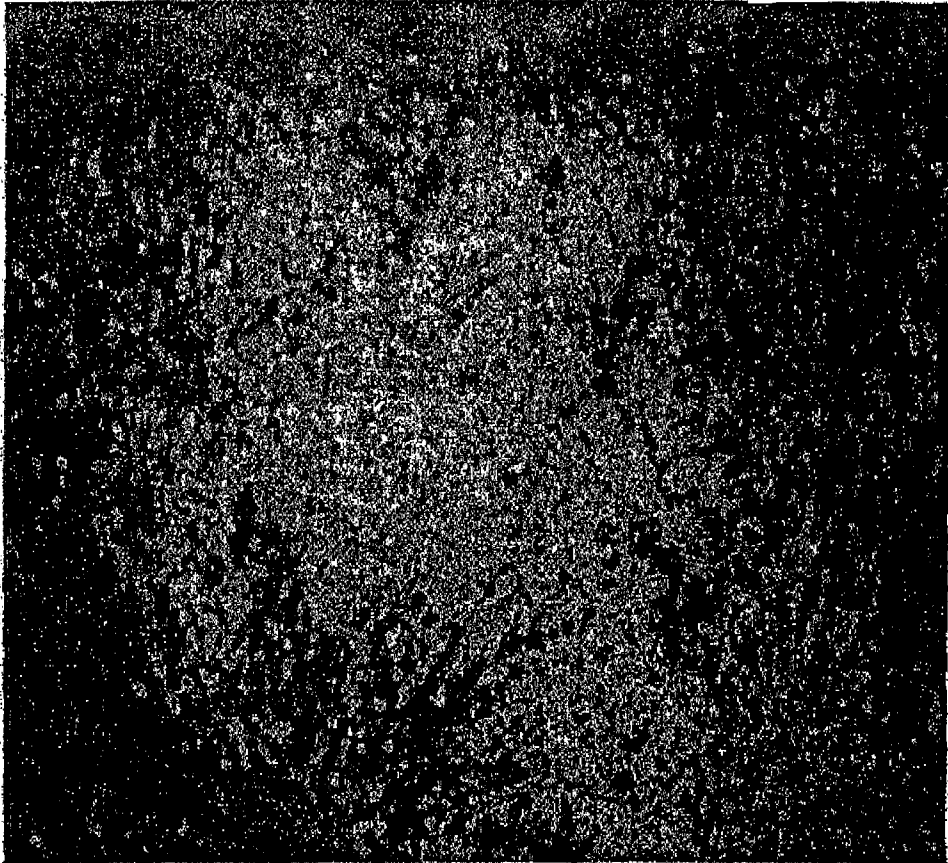


FIG 12

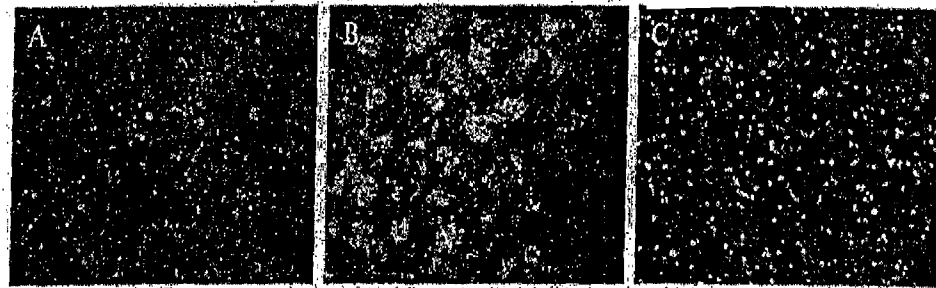


FIG 13

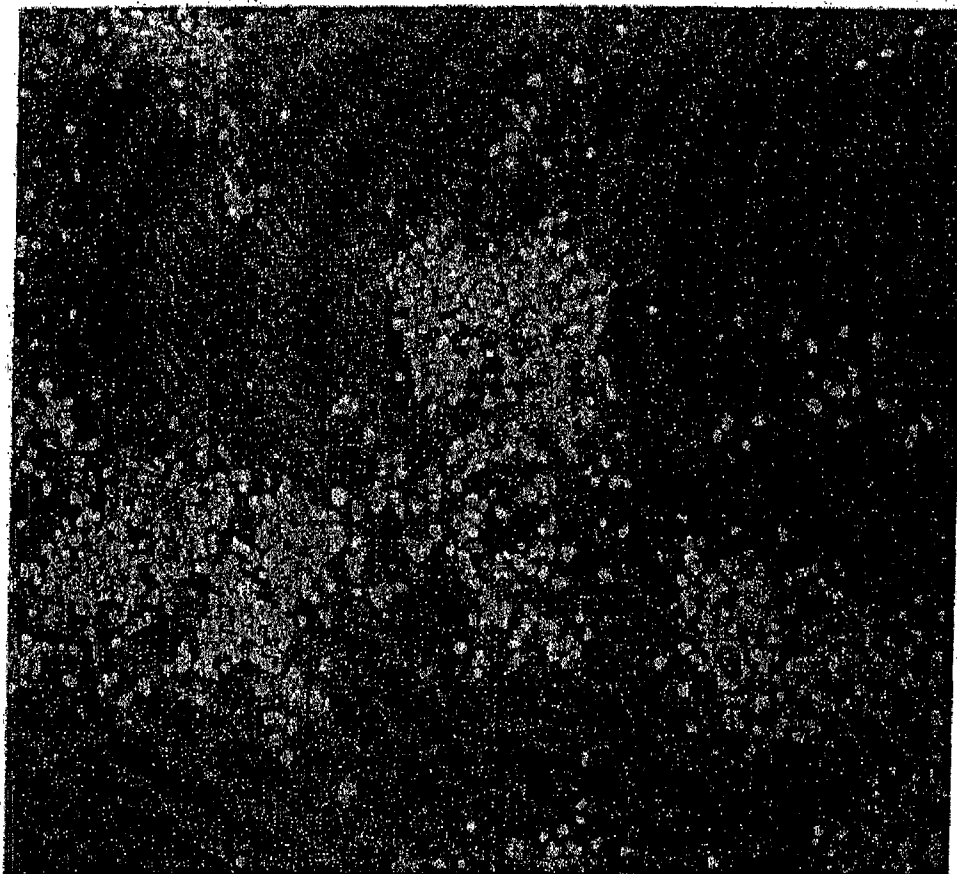


FIG 14

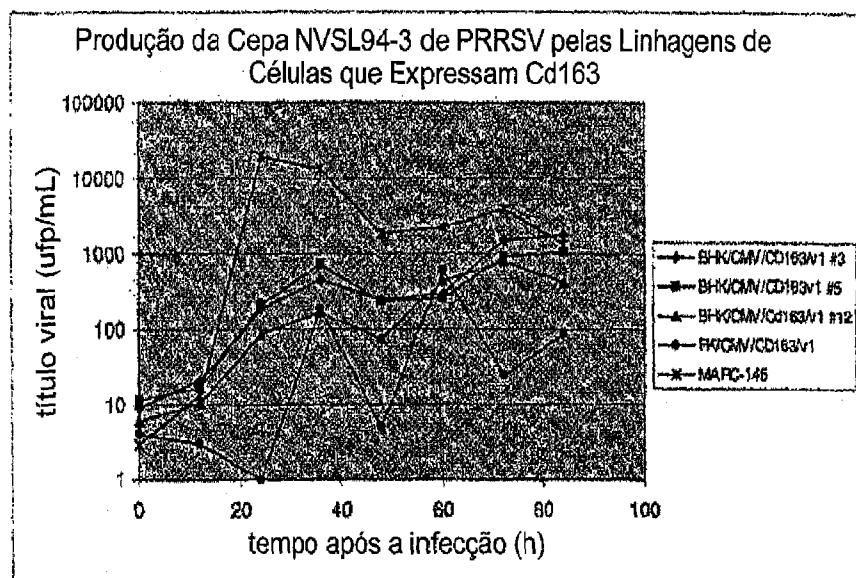


FIG 15

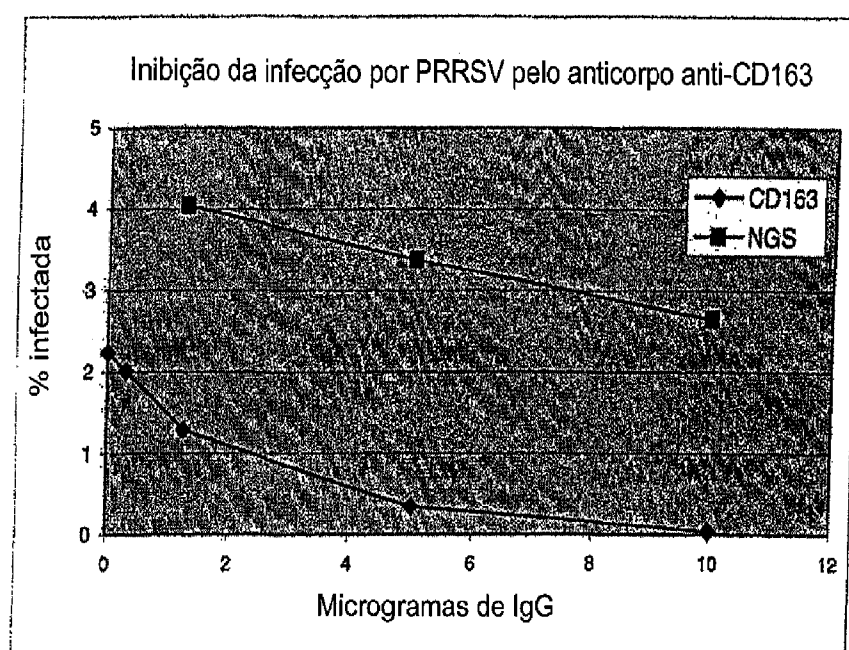


FIG 16

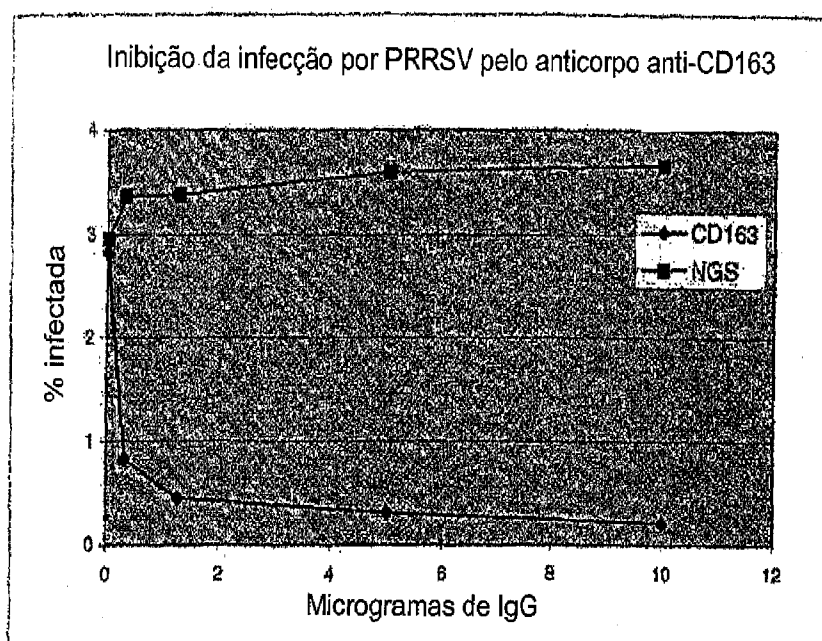


FIG 17

Variações de processamento de CD163 proveniente de células Vero

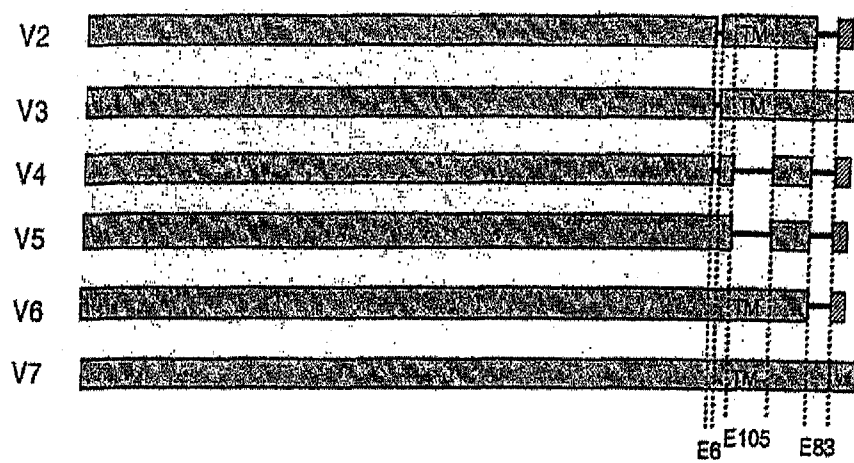


FIG 18

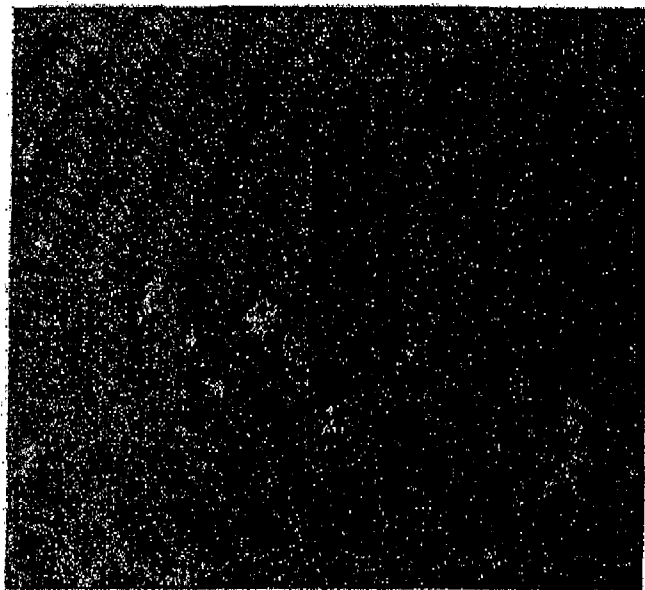


FIG 19

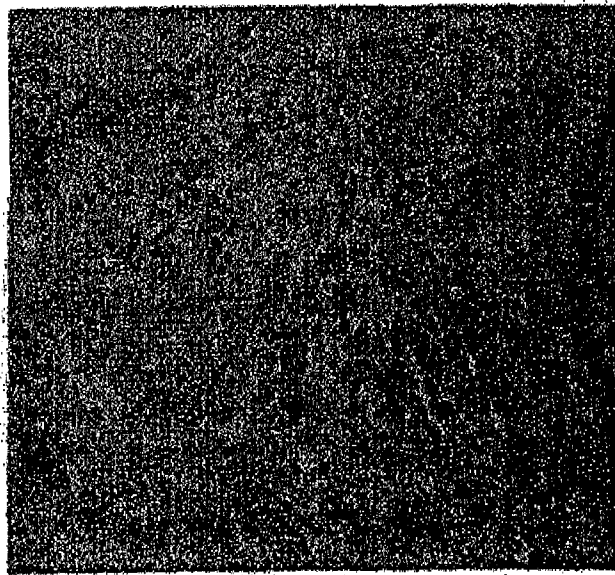


FIG 20A

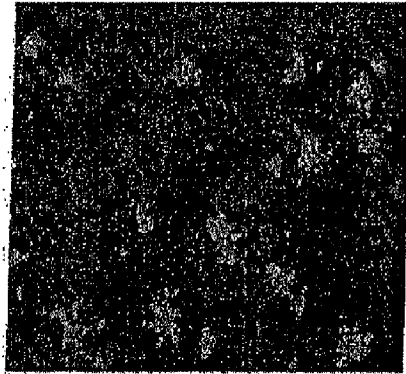


FIG 20B

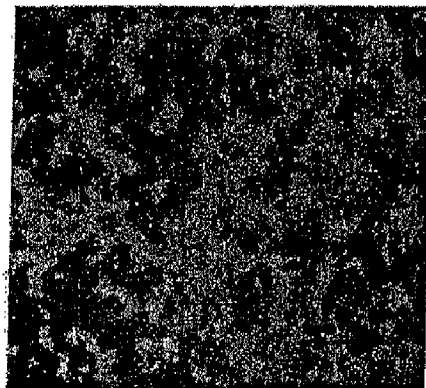


FIG 21A

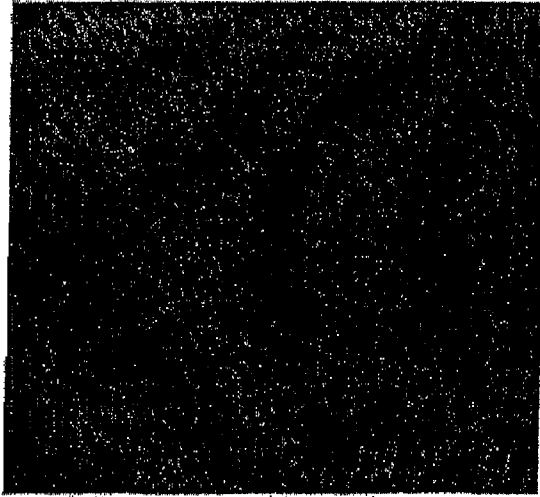
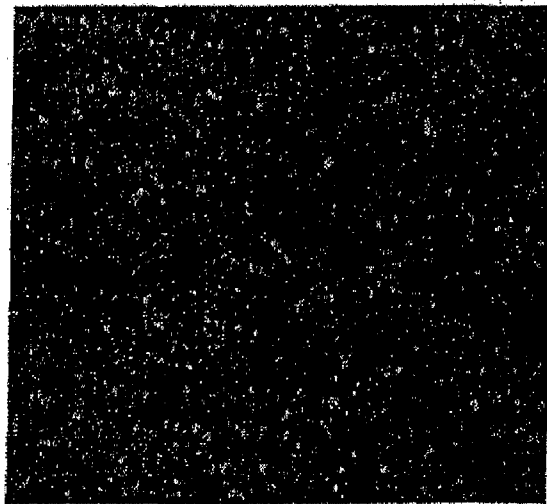


FIG 21B



RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO DE FACILITAÇÃO DA INFECÇÃO DE UMA CÉLULA DE VERTEBRADO POR PRRSV E PARA MEDIR A PROPENSÃO DE UMA LINHAGEM DE CÉLULAS TESTE À REFERIDA INFECÇÃO"**.

5

A presente invenção refere-se a processos e composições relacionados com a produção de células hospedeiras permissivas ao crescimento de vírus, particularmente o vírus das Síndromes Reprodutiva e Respiratória Suínas (PRRS).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



64FBC5C3D155EED8

Campo 2



5E6C1099ABA89CD5

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p141232 21323915_1.txt
- Data de Geração do Código: 23-05-2014
- Hora de Geração do Código: 10:03:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: 64FBC5C3D155EED8
 - Campo 2: 5E6C1099ABA89CD5