

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

(51) Classificação Internacional:

**C12N 7/00** (2015.01) **C12N 7/04** (2015.01)  
**C07K 14/01** (2015.01) **C12N 5/10** (2015.01)  
**A01K 67/27** (2015.01) **C12Q 1/68** (2015.01)  
**C07K 16/08** (2015.01) **G01N 33/569** (2015.01)  
**A61K 39/12** (2015.01)

(22) Data de pedido: **1998.12.04**

(30) Prioridade(s): **1997.12.05 FR 9715396**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.06.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.07.15**  
**208/2015**

(73) Titular(es):

**ZOETIS SERVICES LLC**  
**100 CAMPUS DRIVE, FLORHAM PARK NEW**  
**JERSEY 07932 US**

(72) Inventor(es):

**ANDRÉ JESTIN FR**  
**ROLAND CARIOLET FR**  
**EMMANUEL ALBINA FR**  
**PIERRE LE CANN FR**  
**PHILIPPE BLANCHARD FR**

(74) Mandatário:

**MARIA TERESA DELGADO**  
**AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADO À DOENÇA DO EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (MAP)**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO TEM COMO OBJETO A SEQUÊNCIA GENÓMICA E AS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS QUE CODIFICAM OS POLIPÉPTIDOS DE CIRCOVÍRUS MAP, TAIS COMO OS POLIPÉPTIDOS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS DO DITO CIRCOVÍRUS, ASSIM COMO VETORES QUE INCLUEM AS DITAS SEQUÊNCIAS E CÉLULAS OU ANIMAIS TRANSFORMADOS POR ESSES VETORES. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A PROCESSOS DE DETECÇÃO DESSES ÁCIDOS NUCLEICOS OU POLIPÉPTIDOS E A KITS DE DIAGNÓSTICO DE INFEÇÃO POR UM CIRCOVÍRUS MAP. A INVENÇÃO TAMBÉM CONTEMPLA UM MÉTODO DE SELEÇÃO DE COMPOSTOS CAPAZES DE MODULAR A INFEÇÃO VIRAL. POR ÚLTIMO, A INVENÇÃO COMPREENDE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, PARTICULARMENTE VACINAIS, PARA A PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE INFEÇÕES VIRAIS POR CIRCOVÍRUS MAP ASSIM COMO A UTILIZAÇÃO DO VETOR SEGUNDO A INVENÇÃO PARA A PREVENÇÃO E/OU O TRATAMENTO DE DOENÇAS POR TERAPIA GÉNICA.

**RESUMO****“SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADO À DOENÇA DO  
EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (MAP)”**

A invenção tem como objeto a sequência genômica e as sequências nucleotídicas que codificam os polipéptidos de circovírus MAP, tais como os polipéptidos estruturais e não estruturais do dito circovírus, assim como vetores que incluem as ditas sequências e células ou animais transformados por esses vetores. A invenção também se refere a processos de detecção desses ácidos nucleicos ou polipéptidos e a kits de diagnóstico de infecção por um circovírus MAP. A invenção também contempla um método de seleção de compostos capazes de modular a infecção viral. Por último, a invenção compreende composições farmacêuticas, particularmente vacinais, para a prevenção e/ou tratamento de infecções virais por circovírus MAP assim como a utilização do vetor segundo a invenção para a prevenção e/ou o tratamento de doenças por terapia génica.

## **DESCRIÇÃO**

### **“SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADO À DOENÇA DO EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (MAP)”**

A invenção refere-se a procedimentos de detecção de polipéptidos, a kits de diagnóstico de infecções pelo circovírus MAP de tipo B. A descrição tem por objeto a sequência genómica e as sequências de nucleótidos que codificam os polipéptidos do circovírus MAP, tais como os polipéptidos estruturais e não estruturais do dito circovírus, bem como os vetores que incluem as ditas sequências e as células ou animais transgênicos transformados com os ditos vetores. A descrição refere-se a procedimentos de detecção dos ditos ácidos nucleicos. A invenção refere-se finalmente a anticorpos monoclonais e policlonais que podem reconhecer de forma específica os polipéptidos isolados que têm as sequências SEQ ID N.º 17-20.

A invenção refere-se aos procedimentos de detecção e/ou identificação de um circovírus MAP de tipo B numa amostra biológica, que compreende um polipéptido isolado codificado por uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 90% de identidade com a sequência SEQ ID N.º 12 e que corresponde a uma ORF'2 de um circovírus de tipo B, compreendendo o dito polipéptido um epítipo específico de um circovírus MAP de tipo B apresentando por pelo menos um polipéptido selecionado a partir de SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19 e SEQ ID N.º 20, e à detecção dos complexos de antígeno-anticorpo eventualmente formados.

A invenção refere-se adicionalmente a kits de diagnóstico de uma infecção por circovírus MAP de tipo B numa amostra biológica, que compreendem um polipéptido isolado codificado por uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 90% de identidade com a sequência SEQ ID N.º 12

e que corresponde a uma ORF'2 de um circovírus de tipo B, compreendendo o dito polipéptido um epítipo específico de um circovírus MAP de tipo B apresentado por pelo menos um polipéptido selecionado a partir da SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20, e à detecção dos complexos de antígeno-anticorpo eventualmente formados.

A memória descritiva também se refere a um método de seleção de compostos que possam modular a infecção viral. A descrição compreende, finalmente, composições farmacêuticas, especialmente vacinais, para a prevenção e/ou o tratamento de infecções virais por circovírus MAP assim como a utilização de um vetor de acordo com a descrição para a prevenção e/ou o tratamento de doenças através de terapia génica.

A doença do emagrecimento do leitão (MAP) ou ainda denominada definhamento fatal do leitão (DFP) foi amplamente descrita na América do Norte (Harding, J.C., 1997), e os autores apresentaram a existência de uma relação entre esta patologia e a presença de circovírus porcino (Daft, B. *et al.*, 1996; Clark, E.G., 1997; Harding, J.C., 1997; Harding, J.C. e Clark, E.G., 1997; Nayar, G.P. *et al.*, 1997). Um circovírus porcino já foi detetado em linhas estabelecidas de culturas celulares derivadas de porcos e infetadas cronicamente (Tischer, I., 1986, 1988, 1995; Dulac, G.C., 1989; Edwards, S., 1994; Allan, G.M., 1995 e McNeilly, F., 1996). Este vírus, aquando da infecção experimental de leitões, não se revelou patogénico para os porcos (Tischer, I., 1986, Horner, G.W., 1991) e a sua sequência nucleotídica foi determinada e caracterizada (Tischer, I., 1982; Meehan, B.M. *et al.*, 1997; Mankertz, A., 1997). O circovírus porcino, denominado vírus PCV, pertence ao género circovírus da família circoviridae (Murphy, F.A. *et al.*, 1995) cujo virião possui um ADN circular de comprimento compreendido entre 1,7 e 2,3 kb, ADN que compreende 3 grelhas de leitura aberta (ORF1 a

ORF3), que codificam uma proteína de replicação REP implicada na fase de iniciação e de terminação da replicação por círculo rolante (RCR) (Heyraud-Nitschke, F., *et al.*, 1995; Harding, M.R. *et al.*, 1993; Hanson, S.F. *et al.*, 1995; Fontes, E.P.B. *et al.*, 1994), que codifica uma proteína da cápside (Boulton, L.H. *et al.*, 1997; Hackland, A.F. *et al.*, 1994; Chu. P.W.G. *et al.*, 1993) e que codifica uma proteína não estrutural denominada de disseminação (Lazarowitz, S.G. *et al.*, 1989).

Os autores da presente invenção observaram que as manifestações clínicas perceptíveis nos porcos e relacionadas com a infecção pelo circovírus MAP estão muito individualizadas. Estas manifestações aparecem em geral em porcos de 8 a 12 semanas de idade, desmamados desde 4 a 8 semanas. Os primeiros sinais são a hipotonia sem que se possa falar de prostração. Rapidamente (48 horas), os flancos encovam, a linha dorsal desenha-se, os porcos "branqueiam". Estes sinais são acompanhados em geral de hipertermia, de anorexia e frequentemente de manifestações respiratórias (tosse, dispneia, polipneia). Podem igualmente aparecer diarreias transitórias. A fase do estado de doença dura cerca de um mês findo o qual as taxas de mortalidade variam de 5 a 20%. A estas mortalidades é conveniente adicionar uma proporção variável de animais cadavéricos (5-10%) que não apresentam futuro económico. Deve notar-se que fora deste estado crítico do final do pós-desmame, não é visível qualquer anomalia nas criações. Em particular, a função de reprodução é perfeitamente mantida.

No plano epidemiológico, as primeiras manifestações desta patologia apareceram no início de 1995 no Leste do departamento de Côtes d'Armor em França, e as criações afetadas encontravam-se especialmente confinadas a esta área do departamento. Em dezembro de 1996, o número de criações afetadas não pode ser avaliado com precisão devido

à ausência de um método de diagnóstico específico em laboratório ou de um dispositivo de vigilância epidemiológica da totalidade das cabeças de gado. Com base tanto nos factos clínicos como nos resultados de exames *post-mortem* fornecidos pelos veterinários, pode-se estimar este número em várias dezenas (80-100). O carácter contagioso da doença é fraco a moderado. Têm sido relatados casos fora da zona inicial e na sua maioria são posteriores à transferência de animais provenientes de criações familiares com o problema. Em contrapartida, uma particularidade da condição é a sua forte remanência. Assim, as criações que foram afetadas desde há um ano ainda estão afetadas apesar da administração massiva de terapêuticas. As criações com expressão clínicas são recrutadas nas várias categorias de especialização (maternidade-engorda, pós-desmame-engorda) e são afetadas diferentes estruturas económicas. Por outro lado, os problemas aparecem mesmo nas criações onde as regras da zootecnia são respeitadas.

Foram realizados numerosos exames *post-mortem* seja nas criações seja no laboratório. Os elementos do quadro de lesões são diversos. As lesões macroscópicas mais constantes são a pneumonia que se apresenta por vezes na forma intersticial assim como uma hipertrofia dos gânglios linfáticos. As outras lesões afetam sobretudo as vísceras torácicas das quais se destacam especialmente a pericardite e a pleurisia. No entanto, são igualmente observadas artrites e úlceras gástricas. As lesões reveladas no exame histológico situam-se essencialmente ao nível pulmonar (pneumonia intersticial), dos gânglios (depleção linfoide dos nódulos linfáticos, células gigantes) e renal (glomerulonefrite, vasculite). Os agentes infecciosos foram objeto de amplas investigações. A intervenção dos pestivírus e da doença de Aujeszky pode ser excluída. Os distúrbios aparecem nas varas seropositivas para SDRP

(Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos), mas o papel deste na génese dos distúrbios não pode ser estabelecido (a maioria das criações da Bretanha são seropositivas para SDRP).

Os autores da presente invenção, com o objetivo de identificar o agente etiológico responsável pela MAP, realizaram provas de "contacto" entre leitões manifestamente "doentes" e porcos EOPS (do francês *Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques* - Organismos livres de agentes patogénicos específicos) do CNEVA (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, França). Estas provas permitiram observar o desenvolvimento, nos biotérios protegidos, das manifestações comparáveis àquelas observadas em criação. As manifestações discretas tais como a hipertermia moderada, a anorexia e a diarreia intermitente, apareceram após uma semana de contacto. Deve notar-se que o vírus SDRP apenas se difundiu após as manifestações clínicas. Por outro lado, inoculações de órgãos triturados de animais doentes em animais sãos permitiu reproduzir manifestações parecidas com aquelas observadas nas criações, no entanto, com uma incidência menos forte ligada às condições favoráveis de manutenção dos animais nas instalações experimentais.

Assim, os autores da presente invenção puderam demonstrar que as manifestações patológicas se apresentam como uma entidade bem definida que afeta o porco numa fase particular do seu crescimento.

Esta patologia nunca foi descrita em França. No entanto, informações dispersas especialmente Canadianas relatam factos semelhantes.

Os distúrbios não podem ser controlados pelas terapêuticas existentes.

Os dados recolhidos tanto em criação como em experimentação permitiram relevar os seguintes pontos:

- a doença MAP é transmissível mas é pouco contagiosa,

- a sua origem etiológica é de natureza infecciosa e provavelmente viral,
- a doença MAP apresenta um carácter persistente nas criações atingidas.

Seguem-se consequências económicas consideráveis para as criações.

Assim, uma necessidade importante à data refere-se a um diagnóstico específico e sensível, de realização prática e rápida, permitindo a despistagem precoce da infeção. Um teste fiável, sensível e prático que permita a distinção entre estirpes de circovírus porcino (PCV) é então fortemente desejável.

Por outro lado, continua a ser desejável, e bem tolerado das infeções com circovírus MAP, não estando hoje disponível qualquer vacina contra o circovírus MAP.

Em relação ao circovírus MAP, dever-se-á provavelmente compreender o papel da defesa imunitária na fisiologia e a patologia da doença para desenvolver vacinas satisfatórias.

Uma informação mais ampla relativamente à biologia destas estirpes, as suas interações com os seus hospedeiros, os fenómenos de inatividade associados e especialmente aqueles de evasão às defesas imunitárias do hospedeiro, e finalmente a sua implicação no desenvolvimento das patologias associadas, permitirá uma melhor compreensão destes mecanismos. Tendo em conta as considerações precedentes e que ilustram em particular as limitações dos meios de luta contra a infeção pelo circovírus MAP, é então primordial hoje por um lado desenvolver ferramentas moleculares, especialmente a partir de um melhor conhecimento genético do circovírus MAP, mas igualmente otimizar novos tratamentos preventivos e terapêuticos, novos métodos de diagnóstico e novas estratégias vacinais específicas, eficazes e toleradas. Isto constitui precisamente o objeto da presente invenção.

A presente descrição tem por objeto as sequências



nucleotídicas do genoma de circovírus MAP de sequências SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou um dos seus fragmentos.

As sequências nucleotídicas de sequências SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2 correspondem respetivamente à sequência genómica da cadeia de polaridade (+) e da cadeia de polaridade (-) do circovírus MAP do tipo A (ou PCVA), sendo a sequência SEQ ID N° 2 representada segundo a orientação  $5' \rightarrow 3'$ .

As sequências nucleotídicas de sequências SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 10 correspondem respetivamente à sequência genómica da cadeia de polaridade (+) e da cadeia de polaridade (-) do circovírus MAP do tipo B (ou PCVB), sendo a sequência SEQ ID N° 10 representada segundo a orientação  $5' \rightarrow 3'$ .

A presente descrição tem igualmente como objeto sequências de nucleótidos caracterizadas pelo facto de serem escolhidas a partir de:

- a) uma sequência nucleotídica de um fragmento específico de uma sequência SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, ID SEQ N° 10 ou um dos seus fragmentos;
- b) uma sequência nucleotídica homóloga a uma sequência nucleotídica como definida em a);
- c) uma sequência nucleotídica complementar a uma sequência nucleotídica como definida em a) ou b), e uma sequência nucleotídica do seu ARN correspondente;
- d) uma sequência nucleotídica capaz de hibridar sob condições restritivas com uma sequência tal como definida em a), b) ou c);
- e) uma sequência nucleotídica compreendendo uma sequência tal como definida em a), b), c) ou d); e
- f) uma sequência nucleotídica modificada de uma sequência nucleotídica tal como definida em a), b), c), d) ou e).

Por sequência nucleotídica, polinucleótido ou ácido nucleico, entender-se-á, de acordo com a presente invenção,

tanto um ADN de cadeia dupla ou de cadeia simples em formas monoméricas e diméricas (ditas em série) como produtos de transcrição dos referidos ADNs.

Deve ser entendido que a presente descrição não se refere às sequências nucleotídicas genómicas tomadas no seu ambiente natural, isto é, no seu estado natural. Ela refere-se a sequências que podem ter sido isoladas, purificadas ou parcialmente purificadas, utilizando métodos de separação tais como por exemplo a cromatografia de permuta iónica, por exclusão com base no tamanho molecular, ou por técnicas de afinidade, ou de fracionamento baseadas na solubilidade em diferentes solventes, ou a partir de métodos de engenharia genética, tais como amplificação, clonagem e subclonagem, as sequências da descrição podendo, opcionalmente, ser carregadas por vetores.

As sequências nucleotídicas SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 9 foram obtidas por sequenciação do genoma pelo método de Sanger.

O termo "fragmento de sequência nucleotídica", de acordo com a descrição, entender-se-á designar qualquer fragmento nucleotídico do circovírus MAP, do tipo A ou B, de comprimento de pelo menos 8 nucleótidos, de preferência pelo menos 12 nucleótidos, e ainda mais preferentemente pelo menos 20 nucleótidos consecutivos da sequência da qual procede.

Por "fragmento específico de sequência nucleotídica", de acordo com a descrição, entender-se-á designar qualquer fragmento nucleotídico do circovírus MAP, do tipo A ou B, que apresenta, após alinhamento e comparação com os fragmentos correspondentes de circovírus porcino conhecido, pelo menos um nucleótido ou base de natureza diferente. Por exemplo, os fragmentos nucleotídicos específicos do circovírus MAP de tipo A podem facilmente ser determinados reportando à figura 3 da presente descrição na qual são evidenciados os nucleótidos ou as bases da sequência SEQ ID

Nº 1 (circopordfp) que são de natureza diferente, após alinhamento da referida sequência SEQ ID Nº 1 com as duas outras sequências de circovírus porcino conhecidas (circopormeeh e circopormank).

Por "sequência nucleotídica homóloga" no sentido da presente descrição, entende-se uma sequência nucleotídica que apresenta pelo menos uma percentagem de identidade com as bases de uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição de pelo menos 80%, de preferência 90% e 95%, sendo esta percentagem puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências nucleotídicas podem ser repartidas ao acaso ao longo da totalidade do seu comprimento.

Por "sequência nucleotídica homóloga específica" no sentido da presente descrição, entende-se uma sequência nucleotídica homóloga que apresenta pelo menos uma sequência nucleotídica de um fragmento específico, tal como definido anteriormente. As referidas sequências homólogas "específicas" podem compreender, por exemplo, as sequências correspondentes à sequência genómica ou às sequências dos seus fragmentos representativos de variantes de circovírus MAP do tipo A ou B. Estas sequências homólogas específicas podem assim corresponder a variações ligadas a mutações no seio das estirpes de circovírus MAP do tipo A e B, e corresponder especialmente a truncagens, substituições, deleções e/ou adições de pelo menos um nucleótido. As referidas sequências homólogas podem igualmente corresponder a variações ligadas à degenerescência do código genético.

Na presente descrição, entende-se designar como circovírus MAP, os circovírus associados à doença do emagrecimento do leitão (MAP) do tipo A (PCVA) ou do tipo B (PCVB), aqui de seguida definidas pela sua sequência genómica, assim como os circovírus cujas sequências nucleotídicas são homólogas às sequências de circovírus MAP

do tipo A ou B, tais como especialmente os circovírus correspondentes a variantes do tipo A ou do tipo B.

Por sequência nucleotídica complementar de uma sequência da invenção, entende-se qualquer ADN cujos nucleótidos são complementares àqueles da sequência da invenção, e cuja orientação é inversa (sequência antiparalela).

Entende-se por hibridação nas condições de restringência com uma sequência nucleotídica de acordo com a invenção, uma hibridação em condições de temperatura e de força iónica escolhidas de tal modo que elas permitem a manutenção da hibridação entre dois fragmentos de ADN complementares.

A título ilustrativo, condições de forte restringência da etapa de hibridação para definir os fragmentos nucleotídicos descritos acima, são com vantagem as seguintes.

A hibridação é realizada a uma temperatura preferencial de 65 °C na presença de tampão SSC, 1 x SSC correspondente a 0,15 M de NaCl e 0,05 M de citrato de Na. As etapas de lavagem podem, por exemplo, ser as seguintes:

- 2 x SSC, à temperatura ambiente seguida de 2 lavagens a 2 x SSC, 0,5 % SDS a 65 °C; 2 x 0,5 x SSC, 0,5 % SDS; a 65 °C durante 10 minutos cada um.

As condições de restringência intermédia, utilizando por exemplo uma temperatura de 42 °C na presença de um tampão 2 x SSC, ou de fraca restringência, por exemplo uma temperatura de 37 °C na presença de um tampão 2 x SSC, requerem respetivamente para a hibridação entre as duas sequências uma complementaridade global menos importante.

As condições restritivas de hibridação descritas acima para um polinucleótido de dimensão de cerca de 350 bases serão adaptadas pelo perito na técnica para oligonucleótidos de tamanho maior ou mais pequeno, segundo os ensinamentos de Sambrook et al., 1989.

Das sequências nucleotídicas de acordo com descrição, preferem-se igualmente aquelas utilizáveis como iniciador ou sonda em métodos que permitem obter as sequências homólogas de acordo com a descrição, sendo estes métodos tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a clonagem e a sequenciação de ácido nucleico bem conhecidos pelos peritos na técnica.

Entre as referidas sequências nucleotídicas de acordo com a descrição, as mais preferidas para utilização como iniciador ou sonda em métodos para diagnosticar a presença de circovírus ou uma sua variante tal como definido abaixo.

Sequências nucleotídicas também preferidas de acordo com a descrição são capazes de modular, inibir ou induzir a expressão do gene de circovírus, e/ou capazes de modular o ciclo de replicação de circovírus MAP na célula e/ou no organismo hospedeiro. Destina-se a denotar ciclo de replicação, invasão, proliferação de circovírus, e propagação de célula hospedeira a célula hospedeira no organismo hospedeiro.

Entre as referidas sequências nucleotídicas de acordo com a descrição, aquelas que correspondem a grelhas de leitura aberta, chamadas sequências ORF, e que codificam para polipéptidos são finalmente preferidas, tal como, por exemplo as sequências da SEQ ID N° 3 (ORF1), SEQ ID N° 4 (ORF2) e SEQ ID N° 5 (ORF3), correspondendo, respetivamente, às sequências nucleotídicas compreendidas entre as posições 47-985 determinadas em relação à posição dos nucleótidos na sequência SEQ ID N° 1, as posições 1723-1022 e as posições 658 a 38 em relação à posição dos nucleótidos na sequência SEQ ID N° 2 (representada segundo a orientação 3' → 5'), estando incluídas as extremidades, ou também as sequências SEQ ID N° 11 (ORF'1), SEQ ID N° 12 (ORF'2) e SEQ ID N° 13 (ORF'3), que correspondem respetivamente às sequências compreendidas entre as posições 51-995 determinadas em relação à posição dos

nucleótidos na sequência SEQ ID N° 9, as posições 1734-1033 e as posições 670-357, estando as posições determinadas em relação à posição dos nucleótidos na sequência SEQ ID N° 10 (representada segundo a orientação 3' → 5'), estando incluídas as extremidades.

Os fragmentos de sequência nucleotídica de acordo com a descrição podem ser obtidos, por exemplo, por amplificação específica, tal como PCR, ou após digestão por enzimas de restrição apropriadas de sequências nucleotídicas, sendo estes métodos descritos em particular na obra de Sambrook *et al.*, 1989. Estes referidos fragmentos representativos podem igualmente ser obtidos por síntese química quando a sua dimensão não é demasiado elevada e segundo métodos bem conhecidos pelo perito na técnica.

Por sequência nucleotídica modificada, entende-se qualquer sequência obtida por mutagénese segundo as técnicas bem conhecidas pelo perito na técnica, e incluem modificações em relação às sequências normais segundo a invenção, por exemplo mutações em sequências reguladoras e/ou promotoras da expressão de polipéptido, especialmente que conduzam a uma modificação da taxa de expressão do referido polipéptido ou a uma modulação do ciclo de replicação.

Por "sequência nucleotídica modificada", entende-se igualmente qualquer sequência nucleotídica que codifica para um polipéptido modificado tal como aqui definido abaixo.

A presente descrição tem como objeto as sequências nucleotídicas de circovírus MAP, caracterizadas por serem escolhidas entre as sequências SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou um dos seus fragmentos.

A descrição refere-se também a sequências nucleotídicas caracterizadas por compreenderem uma

sequência nucleotídica selecionada a partir de:

- a) uma sequência nucleotídica SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, ID SEQ N° 13 ou um seu fragmento;
- b) uma sequência nucleotídica de um fragmento específico de uma sequência tal como definida em a);
- c) uma sequência nucleotídica homóloga que compreende pelo menos 80% de identidade com uma sequência tal como definida em a) ou b);
- d) uma sequência nucleotídica complementar ou uma de ARN correspondente a uma sequência conforme definida em a), b) ou c); e
- e) uma sequência nucleotídica modificada de uma sequência conforme definida em a), b), c) ou d).

No que respeita a homologia com as sequências nucleotídicas SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou um dos seus fragmentos, preferem-se as sequências homólogas, especialmente específicas, que apresentem uma percentagem de identidade com uma das sequências SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou um dos seus fragmentos de pelo menos 80%, de preferência 90% ou 95%. As referidas sequências homólogas específicas podem compreender, por exemplo, as sequências correspondentes às sequências ORF1, ORF2, ORF3, ORF'1, ORF'2 e ORF'3 de variantes de circovírus MAP do tipo A o do tipo B. Estas sequências homólogas específicas podem do mesmo modo corresponder a variações ligadas a mutações no seio das estirpes de circovírus MAP do tipo A ou do tipo B e corresponder especialmente a truncagens, substituições, deleções e/ou adições de pelo menos um nucleótido.

Entre as sequências nucleotídicas de acordo com a descrição, é especialmente preferida a sequência SEQ ID N° 11, que tem uma homologia compreendendo mais de 90% de identidade com a sequência SEQ ID N° 3 e SEQ ID N.° 12.

De preferência, a descrição refere-se às sequências nucleotídicas de acordo com a descrição, caracterizadas por compreenderem uma sequência nucleotídica selecionada a partir das seguintes sequências:

- a) 170 5' TGTGGCGA 3';
- b) 450 5' AGTTTCCT 3';
- c) 1026 5' TCATTTAGAGGGTCTTTCAG 3';
- d) 1074 5' GTCAACCT 3';
- e) 1101 5' GTGGTTGC 3';
- f) 1123 5' AGCCCAGG 3';
- g) 1192 5' TTGGCTGG 3';
- h) 1218 5' TCTAGCTCTGGT 3';
- i) 1501 5' ATCTCAGCTCGT 3';
- j) 1536 5' TGTCCCTCCTCTT 3';
- k) 1563 5' TCTCTAGA 3';
- l) 1632 5' TGTACCAA 3';
- m) 1686 5' TCCGTCTT 3'; e a sua sequência complementar.

Na lista de sequências nucleotídicas a)-m) acima, os nucleótidos sublinhados são mutantes em comparação com as duas sequências de circovírus não patogénico conhecidas para porcos. O número que precede a sequência nucleotídica representa a posição do primeiro nucleótido da dita sequência na dita SEQ ID n° 1.

A descrição compreende os polipéptidos codificados por uma sequência nucleotídica segundo a invenção, de preferência um polipéptido cuja sequência é representada por um fragmento, especialmente um fragmento específico, de uma das 6 sequências de aminoácidos representadas pela figura 2, estas 6 sequências de aminoácidos correspondendo aos polipéptidos que podem ser codificados de acordo com um das 3 grelhas de leitura possíveis da sequência SEQ ID N° 1 ou da sequência SEQ ID N° 2, ou um polipéptido cuja sequência é representada por um fragmento, especialmente um fragmento específico, de uma das seis sequências de aminoácidos mostradas na figura 8, estas seis sequências de



aminoácidos correspondendo aos polipéptidos que podem ser codificados segundo uma das 3 grelhas de leitura possíveis da sequência SEQ ID N° 9 ou de sequência SEQ ID N° 10.

A descrição também se refere a polipéptidos caracterizados por compreenderem um polipéptido escolhido entre as sequências de aminoácidos SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16 ou um dos seus fragmentos.

Entre os polipéptidos de acordo com a descrição, o polipéptido de sequência de aminoácidos de SEQ ID N.º 14 que tem homologia com mais de 80% de identidade com a sequência SEQ ID N° 6, bem como o polipéptido de sequência SEQ ID N° 15, são particularmente preferidos.

A descrição também se refere a polipéptidos caracterizados por compreenderem um polipéptido selecionado a partir de:

- a) um fragmento específico de pelo menos 5 aminoácidos de um polipeptídeo da sequência de aminoácidos de acordo com a descrição;
- b) um polipéptido homólogo de um polipéptido tal como definido em a);
- c) um fragmento específico biologicamente ativo de um polipéptido como definido em a) ou b); e
- d) um polipéptido modificado de um polipéptido conforme definido em a), b) ou c).

O termo "polipéptidos", conforme é utilizado na presente memória descritiva, designa preferivelmente os polipéptidos de sequências de aminoácidos SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20, sendo estes polipéptidos especialmente capazes de reconhecer de modo específico os anticorpos produzidos aquando da infeção pelo circovírus MAP do tipo B. Estes polipéptidos apresentam assim epítomos específicos para o circovírus MAP do tipo B e podem, portanto, ser utilizados em particular no campo do diagnóstico ou como agente imunogénico para conferir uma

proteção em porcos contra a infecção pelo circovírus MAP, especialmente do tipo B.

Na presente descrição, os termos polipéptido, péptido e proteína são intermutáveis.

Deve ser entendido que a invenção não se refere a polipéptidos sob a forma natural, ou seja, que não sejam recolhidos no seu ambiente natural mas que puderam ser isolados ou obtidos por purificação a partir de fontes naturais, ou então obtidos por recombinação genética, ou ainda por síntese química e que podem então incluir aminoácidos não naturais, como será aqui descrito seguidamente.

Por "fragmento de polipéptido", de acordo com a descrição, entende-se designar um polipéptido incluindo pelo menos 5 aminoácidos, de preferência 10 aminoácidos ou 15 aminoácidos.

Por "fragmento específico de polipéptido", entende-se designar, na presente descrição, um fragmento de polipéptido codificado por uma sequência nucleotídica de fragmento específico de acordo com a descrição.

Por polipéptido homólogo, entende-se designar os polipéptidos que apresentam, em relação ao polipéptido natural, certas modificações como em particular uma deleção, adição ou substituição de pelo menos um aminoácido, uma truncagem, uma prolongação, uma fusão quimérica e/ou uma mutação. Entre os polipéptidos homólogos, prefere-se aqueles cuja sequência de aminoácidos apresenta pelo menos 80%, de preferência 90%, de homologia com as sequências de aminoácidos dos polipéptidos de acordo com a invenção.

Por "polipéptido homólogo específico", entende-se designar os polipéptidos homólogos tais como definidos anteriormente e apresentando um fragmento específico de polipéptido de acordo com a descrição

No caso de uma substituição, um ou vários aminoácidos

consecutivos ou não consecutivos, são substituídos por aminoácidos "equivalentes". A expressão aminoácido "equivalente" visa aqui designar qualquer aminoácido suscetível de ser substituído num dos aminoácidos da estrutura de base sem no entanto modificar substancialmente as atividades biológicas dos péptidos correspondentes e tais quais serão definidas de seguida.

Estes aminoácidos equivalentes podem ser determinados seja com base na sua homologia de estrutura com os aminoácidos que substituem, ou com base em resultados de ensaios comparativos de atividade biológica entre os diferentes polipéptidos suscetíveis de serem efetuados.

A título de exemplo, mencionam-se as possibilidades de substituições suscetíveis de serem efetuadas sem que de tal resulte uma modificação aprofundada da atividade biológica dos polipéptidos modificados correspondentes, as substituições, por exemplo, da leucina pela valina ou isoleucina, do ácido aspártico pelo ácido glutâmico, da glutamina pela asparagina, da arginina pela lisina, etc., sendo naturalmente de se considerar as substituições inversas nas mesmas condições.

Os polipéptidos homólogos específicos correspondem igualmente aos polipéptidos codificados pelas sequências nucleotídicas homólogas específicas tais como definidas anteriormente e compreendendo assim na presente definição os polipéptidos mutados ou correspondentes a variantes, podendo existir no circovírus MAP, e que correspondem especialmente a truncagens, substituições, deleções e/ou adições de pelo menos um resíduo de aminoácido.

Por "fragmento específico biologicamente ativo de um polipéptido", de acordo com a invenção, entende-se designar em particular um fragmento específico de polipéptido, tal como definido anteriormente, que apresenta pelo menos uma das características dos polipéptidos de acordo com a invenção, especialmente que seja:

- capaz de induzir uma reação de imunogenicidade dirigida contra um circovírus MAP; e/ou
- capaz de ser reconhecido por um anticorpo específico de um polipéptido segundo a invenção; e/ou
- capaz de se ligar a um polipéptido ou a uma sequência nucleotídica de circovírus MAP; e/ou
- capaz de exercer uma atividade fisiológica, mesmo parcial, tal como por exemplo uma atividade de disseminação ou estrutural (cápside); e/ou
- capaz de modular, de induzir ou de inibir a expressão do gene de circovírus MAP ou de uma das suas variantes, e/ou capaz de modular o ciclo de replicação de circovírus MAP na célula e/ou no organismo hospedeiro.

Os fragmentos de polipéptido de acordo com a descrição podem corresponder a fragmentos isolados ou purificados naturalmente presentes num circovírus MAP ou corresponder a fragmentos que podem ser obtidos por clivagem do referido polipéptido por uma enzima proteolítica tal como a tripsina ou a quimiotripsina ou a collagenase, ou por um reagente químico, tal como o brometo de cianogénio (CNBr) ou ainda colocando o referido polipéptido num ambiente muito ácido, por exemplo a pH 2,5. Tais fragmentos polipeptídicos podem ser igualmente preparados indiferentemente por síntese química, a partir de hospedeiros transformados por um vetor de expressão segundo a invenção contendo um ácido nucleico que permita a expressão dos referidos fragmentos, colocados sob o controlo dos elementos de regulação e/ou de expressão apropriados.

Por "polipéptido modificado" de um polipéptido, de acordo com a invenção, entende-se designar um polipéptido obtido por recombinação genética ou por síntese química como será descrito de seguida, apresentando pelo menos uma modificação em relação à sequência normal. Estas modificações poderão especialmente incidir em aminoácidos à origem de uma especificidade, da patogenicidade e/ou da

virulência, ou à origem da conformação estrutural, e da capacidade de inserção membranar do polipéptido segundo a invenção. Poder-se-á assim criar polipéptidos de atividade equivalente, aumentada ou diminuída, e de especificidade equivalente, mais estreita, ou mais larga. Entre os polipéptidos modificados, pode-se citar os polipéptidos nos quais até 5 aminoácidos podem ser modificados, truncados na extremidade N- ou C-terminal, ou ainda deletados, ou então adicionados.

Como é indicado, as modificações do polipéptido terão como objetivo em particular:

- torná-lo capaz de modular, de inibir ou de induzir a expressão do gene do circovírus MAP e/ou capaz de modular o ciclo de replicação de circovírus MAP na célula e/ou no organismo hospedeiro,
- permitir a sua incorporação em composições vacinais,
- modificar a sua biodisponibilidade na qualidade de composto para utilização terapêutica.

Os métodos que permitem evidenciar as ditas modulações em células eucarióticas ou procarióticas são bem conhecidas pelo perito na técnica. Naturalmente que as sequências nucleotídicas que codificam para os referidos polipéptidos modificados poderão ser utilizadas para as referidas modulações, por exemplo por intermédio de vetores de acordo com a descrição e aqui seguidamente descritos, de modo a, por exemplo, prevenir ou tratar as patologias ligadas à infecção.

Os polipéptidos modificados precedentes podem ser obtidos utilizando a química combinatória, na qual é possível fazer variar sistematicamente partes de polipéptido antes de as testar em modelos, por exemplo culturas celulares ou microrganismos, para selecionar os compostos mais ativos ou que apresentam as propriedades procuradas.

A síntese química apresenta igualmente a vantagem de

poder utilizar:

- aminoácidos não naturais, ou
- ligações não peptídicas.

Assim, de modo a melhorar a duração da vida dos polipéptidos de acordo com a invenção, poderá ser interessante utilizar aminoácidos não naturais, por exemplo sob a forma D, ou ainda análogos de aminoácidos, especialmente por exemplo formas sulfuradas.

Finalmente, a estrutura dos polipéptidos de acordo com a invenção, as suas formas homólogas específicas ou modificadas, poderá ser integrada nas estruturas químicas do tipo polipeptídico ou outras. Assim, poderá ser interessante proporcionar nas extremidades terminais N e C compostos não reconhecidos pelas proteases.

A descrição também inclui as sequências nucleotídicas que codificam um polipéptido de acordo com a invenção.

A descrição refere-se também a sequências nucleotídicas adequadas para utilização como iniciador ou sonda, caracterizadas pelas ditas sequências serem selecionadas a partir das sequências nucleotídicas de acordo com a descrição.

Entre os pares de sequências nucleotídicas adequadas para utilização como pares de iniciadores de acordo com a descrição, os pares de iniciadores selecionados de entre os seguintes pares são preferidos:

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', e  
5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', e  
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', e  
5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
- d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', e  
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3'; e
- e) 5' CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CTT GT 3', e  
5' GCA GTA GAC AGG TCA CTC CGT TGT CC 3'.

A clonagem e sequenciação do circovírus MAP, tipo A e B tornou possível a identificação, após a análise comparativa com as sequências de nucleótidos de outros circovírus porcinos, que estavam entre as sequências de fragmentos destes ácidos nucleicos, que são estritamente específicos para os circovírus MAP de tipo A, tipo B e tipo A e B, e os que correspondem a uma sequência de consenso de circovírus porcinos diferentes do tipo de circovírus porcino A e/ou B.

Existe também uma grande necessidade de se dispor de sequências nucleotídicas adequadas para utilização como um iniciador ou sonda específica para a totalidade dos outros circovírus porcinos conhecidos e não patogénicos.

As ditas sequências nucleotídicas de consenso específicas para todos os circovírus, que não circovírus do tipo A e B, são facilmente identificáveis a partir da Figura 3 e SEQ ID N° 9, e são parte da descrição.

Das ditas sequências nucleotídicas de consenso, aquela caracterizada por fazer parte do par de iniciadores seguinte, é preferida:

- a) 5' TGC TCG ACA TTG GTG GTG TG 3' e  
5' TGG AAT GTT AAC CTC TAC AA 3'.

A descrição também compreende uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição, caracterizada pelo facto que a referida sequência é uma sequência de consenso específica de circovírus porcino diferente do circovírus MAP do tipo B e é um dos iniciadores do seguinte par de iniciadores:

- a) 5 ' GCG GCG GCC ATC GGT TGT AAC TT 3', e  
5 ' GAT GGC CCG GAA AGA CGG GTA TC 3'.

Entende-se que a presente invenção também tem por objeto os polipéptidos de circovírus porcinos específicos, diferentes de circovírus MAP, codificados pelas ditas sequências nucleotídicas de consenso suscetíveis de serem obtidas por purificação a partir de polipéptidos naturais,

por recombinação genética ou por síntese química utilizando procedimentos bem conhecidos para um perito na especialidade e como particularmente descritos adiante no presente documento. Do mesmo modo, os anticorpos mono ou policlonais, marcados ou não marcados, dirigidos contra os ditos polipéptidos específicos codificados pelas ditas sequências de nucleotídicas de consenso também estão incluídos da descrição.

As ditas sequências nucleotídicas de consenso, os ditos polipéptidos correspondentes e os ditos anticorpos dirigidos contra os ditos polipéptidos podem ser utilizados em procedimentos ou kits de detecção e/ou identificação como descrito abaixo, em vez de ou em adição às sequências nucleotídicas, polipéptidos ou anticorpos de acordo com a descrição, específicos para o circovírus de tipo A e/ou B.

Estes protocolos foram melhorados para detetar diferencialmente as formas monoméricas circulares de formas replicativas específicas do virião ou de ADN em replicação e as formas diméricas encontradas nas referidas construções moleculares em tandem.

A descrição refere-se ainda à utilização de uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição, como um iniciador ou sonda, para a detecção e/ou amplificação de sequências de ácidos nucleicos.

As sequências nucleotídicas de acordo com a descrição podem, assim, ser utilizadas para amplificar sequências nucleotídicas, nomeadamente pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) (Erlich, 1989, Innis et al, 1990; Rolfs et al, 1991; e White et al. 1997).

Estes iniciadores oligodesoxirribonucleótidos ou oligorribonucleótidos, de preferência têm um comprimento de, pelo menos, 8 nucleótidos de preferência pelo menos 12 nucleótidos, e ainda mais preferencialmente pelo menos 20 nucleótidos.

Outras técnicas para a amplificação do ácido nucleico



alvo podem ser vantajosamente utilizadas como alternativas à PCR.

As sequências nucleotídicas da descrição, em particular os iniciadores de acordo com a descrição, podem também ser utilizadas em outros processos para a amplificação de um ácido nucleico alvo, tais como:

- a técnica TAS (Transcription-based Amplification System), descrita por Kwoh *et al.* em 1989;
- a técnica 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), descrita por Guatelli *et al.* em 1990;
- a técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), descrita por Kievitis *et al.* em 1991;
- a técnica SDA (Strand Displacement Amplification) (Walker *et al.*, 1992);
- a técnica TMA (Transcription Mediated Amplification).

Os polinucleótidos de acordo com a descrição podem também ser utilizados em técnicas de amplificação ou modificação do ácido nucleico que serve como sonda, tais como:

- a técnica LCR (Ligase Chain Reaction), descrita por Landegren *et al.* em 1988 e aperfeiçoada por Barany *et al.* em 1991, que utiliza uma ligase termoestável;
- a técnica de RCR (Repair Chain Reaction), descrita por Segev em 1992;
- a técnica CPR (Cycling Probe Reaction), descrita por Duck *et al.* em 1990;
- a técnica de amplificação com Q-beta-replicase, descrita por Miele *et al.* em 1983 e aperfeiçoada particularmente por Chu *et al.* em 1986, Lizardi *et al.* em 1988, e por Burg *et al.*, e por Stone *et al.* em 1996.

No caso em que, opcionalmente, o polinucleótido alvo a ser detetado seja um ARN, por exemplo um ARNm, será possível utilizar, antes da implementação de uma reação de amplificação utilizando pelo menos um iniciador de acordo com a descrição ou a implementação de um procedimento de

deteção usando pelo menos uma sonda da de acordo com a descrição, uma enzima do tipo transcriptase reversa, a fim de se obter um ADNc a partir do ARN contido na amostra biológica. O ADNc obtido irá então servir como alvo para o(s) iniciador(es) ou a(s) sonda(s) utilizados no procedimento de amplificação ou detecção de acordo com a descrição.

A sonda de detecção será escolhida de modo que hibrida com a sequência alvo ou fragmento amplificado gerado a partir da sequência alvo. Tal sonda de detecção terá vantajosamente como sequência uma sequência de pelo menos 12 nucleótidos, em particular de pelo menos 20 nucleótidos e de preferência pelo menos 100 nucleótidos.

A descrição também compreende sequências nucleotídicas adequadas para utilização como uma sonda ou iniciador de acordo com a descrição, caracterizadas por serem marcadas com um composto radioativo ou com um composto não radioativo.

As sequências nucleotídicas não marcadas podem ser utilizadas diretamente como sondas ou iniciadores, no entanto, as sequências são geralmente marcadas com um elemento radioativo ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ) ou com uma molécula não radioativa (biotina, acetilaminofluoreno, digoxigenina, 5-bromodesoxiuridina, fluoresceína) para se obter sondas adequadas para numerosas aplicações.

Exemplos de marcação não radioativa de sequências nucleotídicas encontram-se descritos, por exemplo, na Patente Francesa N.º 78.10975 ou por Urdea *et al.* ou por Sanchez-Pescador *et al.* 1988.

No último caso, pode-se também utilizar qualquer um dos métodos de marcação descritos nas patentes FR-2422956 e FR 2518755.

A técnica de hibridação pode ser realizada de diversas maneiras (Matthews *et al.* 1988). O método mais geral consiste em imobilizar o ácido nucleico extraído a partir

de células sobre um suporte (por exemplo, nitrocelulose, nylon, poliestireno) e incubar sob condições definidas, o ácido nucleico alvo imobilizado com a sonda. Depois da hibridação, o excesso de sonda é removido e as moléculas híbridas formadas são detetadas por um método apropriado (medição da radioatividade, fluorescência ou da atividade enzimática ligada à sonda).

A descrição compreende também as sequências nucleotídicas de acordo com a descrição, caracterizadas por serem imobilizadas sobre um suporte, covalente ou não covalente.

De acordo com outra forma de realização vantajosa das sequências nucleotídicas de acordo com a descrição, estas últimas podem ser utilizadas imobilizadas sobre um suporte e, assim, servir para capturar, por hibridação específica o ácido nucleico alvo obtido a partir da amostra biológica a ser testada. Se necessário, o suporte sólido é separado da amostra e o complexo de hibridação formado entre a referida sonda de captura e o ácido nucleico alvo é em seguida detetada usando uma segunda sonda, ou sonda de detecção, marcada com um elemento facilmente detetável.

Um outro objeto da presente descrição é um vetor para a clonagem e/ou expressão de uma sequência, caracterizada pelo facto de conter uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição.

Os vetores de acordo com a descrição, caracterizados por compreenderem os elementos que permitem a expressão e/ou a secreção das referidas sequências nucleotídicas numa determinada célula hospedeira, são igualmente parte da descrição.

O vetor deve então incluir um promotor, sinais de iniciação e de terminação da tradução, assim como regiões apropriadas de regulação da transcrição. Deve poder ser mantido de modo estável na célula hospedeira e pode opcionalmente possuir sinais particulares que especificam a

secreção da proteína traduzida. Estes diferentes elementos são escolhidos em função da célula hospedeira utilizada. Para este efeito, as sequências nucleotídicas segundo a invenção podem ser inseridas em vetores com replicação autónoma no seio do hospedeiro escolhido, ou de vetores integrados do hospedeiro escolhido.

Tais vetores serão preparados de acordo com os métodos correntemente utilizados pelo perito na técnica, e os clones que resultam poderão ser introduzidos num hospedeiro apropriado pelos métodos convencionais, tais como por exemplo a lipofecção, a eletroporação e o choque térmico.

Estes vetores são por exemplo vetores de origem plasmídica ou viral.

Os vetores de acordo com a descrição são por exemplo vetores de origem de plasmídeo ou virais.

Um vetor preferido para a expressão dos polipéptidos da descrição é o baculovírus.

O vetor pBS KS no qual é inserida a sequência de ADN em tandem do circovírus MAP do tipo A (ou DFP) tal como depositado na CNCM a 3 de julho de 1997, com o número I-1891, é também preferido.

Estes vetores são úteis para transformar células hospedeiras de modo a clonar ou expressar as sequências nucleotídicas de acordo com a descrição.

A descrição compreende igualmente as células hospedeiras transformadas por um vetor de acordo com a descrição.

Estas células podem ser obtidas pela introdução em células hospedeiras de uma sequência nucleotídica inserida num vetor tal como definido acima, e depois colocando em cultura as referidas células em condições que permitem a replicação e/ou a expressão da sequência nucleotídica transfectada.

O hospedeiro celular pode ser selecionado de entre sistemas procarióticos ou eucarióticos, como por exemplo as

células bacterianas (Olins e Lee, 1993), mas igualmente as células de levedura (Buckholz, 1993), mesmo células animais, em particular as culturas de células de mamíferos (Edwards e Aruffo, 1993), e especialmente as células de ovário de hamster chinês (CHO), mas igualmente as células de insectos nas quais se podem utilizar os procedimentos que empregam por exemplo os baculovírus (Luckow, 1993).

Uma célula hospedeira preferida para a expressão das proteínas da descrição é constituída pelas células de insectos sf9.

Uma célula hospedeira preferida também de acordo com a descrição é *E. coli*, tal como depositada na CNCM a 3 de julho de 1997, sob o número I-1891.

A descrição refere-se igualmente aos animais, compreendendo uma das ditas células transformadas de acordo com a descrição.

A obtenção de animais transgénicos de acordo com a descrição que sobre-expressam um ou vários genes de circovírus MAP ou parte dos genes será levada a cabo de forma preferida em ratos, ratinhos ou coelhos segundo métodos bem conhecidos pelo perito na técnica tais como por transfeções, virais ou não virais. Os animais transgénicos que sobre-expressam um ou vários dos referidos genes poderão ser obtidos por transfeção de cópias múltiplas dos referidos genes sob o controlo de um promotor forte que possua uma natureza ubíqua, ou seletivo de um tipo de tecido. Os animais transgénicos poderão ser igualmente obtidos por recombinação homóloga em estirpes de células embrionárias, transferência destas estirpes celulares para embriões, seleção das quimeras afetadas ao nível das linhagens reprodutoras e crescimento das referidas quimeras.

As células transformadas assim como os animais transgénicos de acordo com a descrição podem ser utilizados nos processos de preparação dos polipéptidos recombinantes.

É hoje possível produzir polipéptidos recombinantes em quantidades relativamente significativas por engenharia genética utilizando células transformadas por vetores de expressão ou utilizando animais transgênicos segundo a descrição.

Os procedimentos de preparação de um polipéptido da descrição sob forma recombinante, caracterizados por utilizarem um vetor e/ou uma célula transformada por um vetor e/ou um animal transgênico que compreende uma das ditas células transformadas de acordo com a descrição, estão compreendidos por sua vez na presente descrição.

Entre os ditos procedimentos de preparação de um polipéptido da descrição sob a forma recombinante, preferem-se os procedimentos de preparação que utilizam um vetor e/ou uma célula transformada pelo dito vetor e/ou um animal transgênico que compreende uma das ditas células transformadas, contendo uma sequência nucleotídica segundo a descrição que codifica para um polipéptido de circovírus MAP.

Os polipéptidos recombinantes obtidos como indicado acima, podem tanto se apresentar sob forma glicosilada como não glicosilada e podem apresentar ou não a estrutura terciária natural.

Uma variante preferida consiste em produzir um polipéptido recombinante fundido a uma proteína "portadora" (proteína quimérica). A vantagem deste sistema é permitir uma estabilização e uma diminuição da proteólise do produto recombinante, um aumento da solubilidade no decurso da renaturação *in vitro* e/ou uma simplificação da purificação quando o par de fusão possui uma afinidade para um ligando específico.

Mais particularmente, a descrição refere-se a um procedimento para a preparação de um polipéptido da descrição que inclui as etapas seguintes:

a) cultura das células transformadas sob condições que

permitem a expressão de um polipéptido recombinante de sequência nucleotídica de acordo com a descrição;

b) se adequado, recuperação do referido polipéptido recombinante.

Quando o procedimento de preparação de um polipéptido envolve um animal transgénico de acordo com a descrição, o polipéptido recombinante é seguidamente extraído do dito animal.

A descrição tem também por objeto polipéptido adequado para ser obtido utilizando um procedimento da descrição, como descrito acima.

A descrição também compreende um procedimento para a preparação de um polipéptido sintético, caracterizado por utilizar uma sequência de aminoácidos de polipeptídeos de acordo com a descrição.

A descrição também se refere a um polipéptido sintético obtido utilizando um procedimento, de acordo com a descrição.

Os polipéptidos de acordo com a descrição podem também ser preparados utilizando técnicas convencionais no campo da síntese de péptidos. Esta síntese pode ser realizada em solução homogénea ou em fase sólida.

Por exemplo, pode-se recorrer à técnica de sínteses em solução homogénea descrita por Houben-Weyl em 1974.

Este método de síntese consiste em condensar sucessivamente, dois a dois, os aminoácidos sucessivos na ordem requerida, ou em condensar aminoácidos e fragmentos previamente formados e contendo já vários aminoácidos na ordem apropriada, ou ainda vários fragmentos previamente assim preparados, sendo que naturalmente se cuidará em proteger previamente todas as funções reativas nestes aminoácidos ou fragmentos, à exceção das funções amina de um e carboxilo de outro ou vice-versa, que devem normalmente intervir na formação das ligações peptídicas, especialmente após ativação da função carboxilo, de acordo

com os métodos bem conhecidos na síntese dos péptidos.

Segundo outra técnica preferida da descrição, recorreu-se àquela descrita por Merrifield.

Para fabricar uma cadeia peptídica segundo o procedimento de Merrifield, recorreu-se a uma resina polimérica muito porosa, na qual se fixa o primeiro aminoácido C-terminal da cadeia. Este aminoácido é fixado sobre uma resina por intermédio do seu grupo carboxílico e a sua função amina é protegida. Fixam-se assim, uns após os outros, os aminoácidos que vão constituir a cadeia peptídica no grupo amina de cada vez previamente desprotegido da porção da cadeia peptídica já formada, e que está ligado à resina. Quando a totalidade da cadeia peptídica desejada está formada, eliminam-se os grupos protetores dos diferentes aminoácidos que constituem a cadeia peptídica e remove-se o péptido da resina com auxílio de um ácido.

A descrição refere-se ainda a polipéptidos híbridos que têm pelo menos um polipéptido de acordo com a descrição, e uma sequência de um polipéptido capaz de induzir uma resposta imunitária em seres humanos ou animais.

De forma vantajosa, o determinante antigénico é tal que é capaz de induzir uma resposta humoral e/ou celular.

O dito determinante pode compreender um polipéptido de acordo com a descrição na forma glicosilada utilizado para se obter composições imunogénicas suscetíveis de induzir a síntese de anticorpos contra múltiplos epítomos. Os ditos polipéptidos ou os seus fragmentos glicosiladas também fazem parte da descrição.

Estas moléculas híbridas podem consistir em parte de uma molécula transportadora de polipéptidos ou seus fragmentos, de acordo com a descrição, associada a uma parte possivelmente imunogénica, em particular, um epítomo da toxina da difteria, toxina do tétano, um antigénio de



superfície do vírus da hepatite B (patente FR 79 21811), o antigénio de VP1 do vírus da poliomielite ou qualquer outra toxina ou antigénio viral ou bacteriano.

Os procedimentos para a síntese de moléculas híbridas compreendem os métodos utilizados em engenharia genética para construir sequências nucleotídicas híbridas que codificam para as sequências de polipéptidos procuradas. Pode fazer-se referência, por exemplo, vantajosamente à técnica para a obtenção de genes que codificam as proteínas de fusão descritas por Minton, em 1984.

As ditas sequências nucleotídicas híbridas que codificam para um polipéptido híbrido, bem como os polipéptidos híbridos de acordo com a descrição, caracterizado pelo facto de ser polipéptidos recombinantes obtidos pela expressão das ditas sequências nucleotídicas híbridas, também fazem parte da descrição.

A descrição compreende também os vetores caracterizados pelo facto de conter uma das ditas sequências nucleotídicas híbridas. As células hospedeiras transformadas pelos ditos vetores, os animais transgénicos, compreendendo uma das referidas transformadas e os métodos de preparação de polipeptídeos recombinantes utilizando os referidos vetores, das referidas células transformadas e/ou as referidas células de animais transgénicos são, claro, também parte da descrição.

Os polipéptidos de acordo com a invenção, os anticorpos de acordo com a descrição e as sequências nucleotídicas de acordo com a descrição podem ser vantajosamente utilizadas em procedimentos para a deteção e/ou identificação de circovírus MAP, ou circovírus porcos diferentes de um circovírus MAP, numa amostra biológica (tecido ou fluido biológico) suscetível de os conter. Estes procedimentos, de acordo com a especificidade dos polipéptidos, dos anticorpos e das sequências nucleotídicas de acordo com a descrição que se utilizarão,

poderão detetar e/ou identificar em particular um circovírus MAP ou um circovírus porcino diferente de um circovírus MAP ou diferente do circovírus MAP do tipo B.

Os polipéptidos de acordo com a invenção podem ser vantajosamente utilizados num procedimento para a deteção e/ou identificação do circovírus MAP de tipo A, tipo B, tipo A ou B, de circovírus porcino diferente do circovírus MAP de tipo A ou B, numa amostra biológica (tecido ou fluido biológico) suscetível de os conter, caracterizado por compreender as etapas seguintes:

- a) o contacto da referida amostra biológica com um polipéptido ou um seu fragmento de acordo com a descrição (sob condições que permitam uma reação imunológica entre o dito polipéptido e os anticorpos possivelmente presentes na amostra biológica);
- b) a identificação dos complexos de antígeno-anticorpo possivelmente formados.

Na presente descrição, por circovírus MAP designar-se-á, salvo indicação em contrário, um circovírus MAP de tipo A ou B, e o por circovírus porcino diferente de MAP, salvo indicação em contrário, um circovírus porcino que não seja um circovírus MAP do tipo A e B.

De preferência, a amostra biológica é constituída por um fluido, por exemplo um soro de porco, sangue total ou biópsias.

Qualquer procedimento convencional pode ser utilizado para alcançar a dita deteção dos complexos antígeno-anticorpo eventualmente formados.

Por exemplo, um método preferido emprega processos imunoenzimáticos de acordo com a técnica de ELISA, por imunofluorescência, ou radio-imunológicos (RIA) ou equivalente.

Assim, a descrição refere-se também aos polipéptidos de acordo com a descrição, marcados com um marcador adequado, tal como do tipo enzimático, fluorescente,

radioativo.

Os ditos métodos compreendem, por exemplo, as etapas seguintes:

- depósito de quantidades determinadas de uma composição polipeptídica, de acordo com a descrição, nos poços de uma placa de microtitulação,
- introdução nos ditos poços de diluições crescentes do soro, ou outra amostra biológica, tal como definido acima, para ser analisado,
- incubação da microplaca
- introdução nos poços da placa de microtitulação de anticorpos marcados dirigidos contra imunoglobulinas de porco, a marcação destes anticorpos tendo sido realizada usando uma enzima selecionada entre aquelas que são capazes de hidrolisar um substrato modificando a absorção das radiações deste último, pelo menos, num comprimento de onda determinado, por exemplo, a 550 nm,
- deteção, por comparação com um indicador de controlo, da quantidade de substrato hidrolisada.

A invenção também se refere a um kit ou conjunto para a deteção e/ou identificação de circovírus MAP, circovírus porcino diferente de circovírus MAP ou de circovírus porcino diferente do circovírus MAP de tipo B, caracterizado por compreender os seguintes elementos:

- um polipeptídeo de acordo com a descrição,
- se adequado, os reagentes para constituir o meio adequado para a reação imunológica ou específica,
- se adequado, os reagentes para a deteção de complexos antígeno-anticorpo produzidos pela reação imunológica entre o ou os polipéptidos da descrição e os anticorpos eventualmente presentes na amostra biológica, podendo tais reagentes conter também um marcador, ou ser capazes de ser reconhecidos por sua vez por um reagente marcado, mais particularmente no caso em que o polipeptídeo de acordo com a descrição não está marcado,

- se adequado, uma amostra biológica de referência (controlo negativo) sem anticorpos reconhecidos por um polipeptídeo de acordo com a descrição,
- se adequado, uma amostra biológica de referência (controlo positivo) contendo uma quantidade predeterminada de anticorpos reconhecidos por um polipéptido de acordo com a descrição.

Os polipéptidos de acordo com a descrição permitem preparar anticorpos monoclonais ou policlonais caracterizados por reconhecerem especificamente os polipéptidos de acordo com a invenção. Os anticorpos monoclonais podem ser vantajosamente preparados a partir de hibridomas de acordo com a técnica descrita por Kohler e Milstein em 1975. Os anticorpos policlonais podem ser preparados, por exemplo, através da imunização de um animal, em particular um ratinho, com um polipéptido de acordo invenção ou um ADN, de acordo com a descrição, associado a um adjuvante da resposta imunitária, e em seguida, a purificação dos anticorpos específicos contidos no soro dos animais imunizados numa coluna de afinidade sobre a qual se qual se fixou previamente o polipéptido que serviu de antigénio. Os anticorpos policlonais de acordo com a descrição, também podem ser preparados por purificação, numa coluna de afinidade em que foi previamente imobilizado um polipéptido de acordo com a descrição, dos anticorpos contidos no soro de um suíno infetado por um circovírus MAP.

A descrição também tem por objeto anticorpos mono ou policlonais ou seus fragmentos, ou anticorpos quiméricos, que são capazes de reconhecer especificamente um polipéptido isolado que tem uma sequência selecionada entre as sequências SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20.

A descrição também tem por objeto anticorpos monoclonais ou os seus fragmentos, ou anticorpos

quiméricos, que podem reconhecer especificamente um polipéptido isolado que tem uma sequência selecionada entre as sequências SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20.

Os anticorpos da descrição também podem ser marcados da mesma maneira como descrito anteriormente para as sondas nucleicas da descrição, tais como um marcador de tipo enzimático, fluorescente ou radioativo.

A descrição proporciona ainda um procedimento para a detecção e/ou identificação de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de um circovírus MAP, tipo ou diferente do circovírus MAP do tipo B, numa amostra biológica, caracterizado por compreender as etapas de:

- a) colocar em contacto a amostra biológica (tecido ou fluido biológico) com um anticorpo mono ou policlonal, de acordo com a descrição (sob condições que permitam uma reação imunológica entre os ditos anticorpos e os polipéptidos de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de um circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de circovírus MAP do tipo B, eventualmente presentes na amostra biológica);
- b) identificar o complexo antigénio-anticorpo eventualmente formado.

Também entra dentro do âmbito da descrição, um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de circovírus MAP ou de circovírus porcino diferente de circovírus MAP de tipo B, caracterizado por compreender os seguintes elementos:

- um anticorpo monoclonal ou policlonal de acordo com a descrição, se apropriado;
- se adequado, um reagente para constituir o meio adequado para realizar a reação imunológica;
- se adequado, um reagente para a detecção de complexos antígeno-anticorpo produzidos pela reação imunológica, este reagente pode também conter um marcador, ou ser

capaz de ser reconhecido por sua vez, por um reagente marcado, mais particularmente no caso em que dito anticorpo monoclonal ou policlonal não esteja marcado;

- se adequado, os reagentes para a realização da lise das células da amostra de teste.

A presente descrição também tem por objeto um procedimento para a detecção e/ou identificação de MAP, de circovírus porcino diferente de um circovírus MAP ou de circovírus porcino diferente do circovírus MAP de tipo B, numa amostra biológica, caracterizado por utilizar uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição.

Mais particularmente, a descrição refere-se a um procedimento para a detecção e/ou identificação de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de circovírus MAP ou de circovírus porcino diferente do circovírus MAP do tipo B, numa amostra biológica, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) se adequado, o isolamento do ADN a partir da amostra biológica a ser analisada;
- b) amplificação específica do ADN da amostra com, pelo menos, um iniciador, ou um par de iniciadores, de acordo com a descrição;
- c) identificação dos produtos de amplificação.

Estes podem ser detetados, por exemplo, pela técnica de hibridação molecular, utilizando uma sonda nucleica de acordo com a descrição. Esta sonda estará vantajosamente marcada por um elemento não radioativo (sonda fria) ou radioativo.

Para os fins desta descrição, deve ser entendido como significando "ADN da amostra biológica" ou "ADN contido na amostra biológica" o ADN presente na amostra biológica em questão, ou, eventualmente, o ADNc obtido após a ação de uma enzima do tipo transcriptase reversa sobre o ARN presente na dita amostra biológica.

Outro objetivo da presente descrição consiste num

procedimento de acordo com a descrição, caracterizado pelo facto de compreender as etapas seguintes:

- a) contactar uma sonda nucleotídica de acordo com a descrição, com uma amostra biológica, o ADN contido na amostra biológica tendo, se necessário, sido previamente tornado acessível para hibridação, em condições que permitam a hibridação da sonda de ADN a partir da amostra;
- b) demonstração do híbrido formado entre a sonda nucleotídica e o ADN da amostra biológica.

A presente descrição refere-se também a um procedimento, de acordo com a descrição, caracterizado por compreender as etapas seguintes:

- a) contactar uma sonda nucleotídica imobilizada sobre um suporte, de acordo com a descrição, com uma amostra biológica, o ADN da amostra, eventualmente, tendo sido previamente tornado acessível para hibridação, sob condições que permitem a hibridação da sonda com o ADN da amostra;
- b) contactar o híbrido formado entre a sonda nucleotídica imobilizada sobre um suporte e o ADN contido na amostra biológica, se for o caso, após a remoção do ADN da amostra biológica que não se tenha hibridado com a sonda, com uma sonda nucleotídica marcada de acordo com a descrição;
- c) identificação do novo híbrido formado na etapa b).

De acordo com uma forma de realização vantajosa do procedimento de deteção e/ou identificação anteriormente definido, este é caracterizado porque, previamente à etapa a), o ADN da amostra biológica é primeiro amplificado utilizando pelo menos um iniciador de acordo com a descrição.

A descrição proporciona ainda um kit ou conjunto para a deteção e/ou identificação de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de circovírus MAP ou de

circovírus porcino diferente de circovírus MAP de tipo B, caracterizado por incluir os seguintes elementos:

- a) uma sonda nucleotídica de acordo com a descrição;
- b) se adequado, os reagentes necessários para a realização de uma reação de hibridação;
- c) se adequado, pelo menos um iniciador de acordo com a descrição e os reagentes necessários para uma reação de amplificação de ADN.

A invenção refere-se também a um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de circovírus MAP ou circovírus porcino diferente de circovírus MAP de tipo B, caracterizado por compreender os seguintes elementos:

- a) uma sonda nucleotídica, chamada sonda de captura, de acordo com a descrição;
- b) uma sonda oligonucleotídica, denominada sonda de revelação, de acordo com a descrição;
- c) se adequado, pelo menos um iniciador de acordo com a descrição e os reagentes necessários para uma reação de amplificação de ADN.

A descrição também se refere a um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus MAP, de circovírus porcino diferente de um circovírus MAP ou circovírus porcino diferente de um circovírus MAP do tipo B, caracterizado por compreender os seguintes elementos:

- a) pelo menos um iniciador de acordo com a descrição;
- b) se adequado, os reagentes necessários para a realização de uma reação de amplificação do ADN;
- c) se adequado, um componente que permite a verificação da sequência do fragmento amplificado, especificamente uma sonda oligonucleotídica de acordo com a descrição.

Pode-se utilizar um anticorpo de acordo com a descrição para selecionar o composto orgânico ou inorgânico capaz de modular, induzir ou inibir a expressão dos genes, e/ou de modificar a replicação celular do circovírus MAP ou



capaz de induzir ou inibir as patologias vinculadas a uma infecção por um circovírus MAP.

A descrição também compreende um método de seleção de compostos capazes de se ligar a um polipéptido ou um fragmento do mesmo, de acordo com a descrição, capazes de se ligar a uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição, descrito ou capazes de reconhecer um anticorpo de acordo com a descrição, e/ou capazes de modular, inibir ou induzir a expressão de genes, e/ou modificar a replicação celular de circovírus MAP ou capazes de induzir ou inibir estados patológicos associados com a infecção pelo circovírus MAP, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) contactar o dito composto com o dito polipeptídeo, em que a dita sequência nucleotídica, com uma célula transformada de acordo com a descrição e/ou a administração do dito composto a um animal transformado, de acordo com a descrição;
- b) determinar a capacidade do dito composto para se ligar ao dito polipéptido ou sequência nucleotídica, ou modular, inibir ou induzir a expressão de genes, ou modular o crescimento ou a replicação de circovírus MAP, ou induzir ou inibir no dito animal transformado as patologias relacionadas com uma infecção por circovírus MAP (denominada atividade do dito composto).

Os compostos capazes de serem selecionados podem ser compostos orgânicos, tais como polipéptidos ou hidratos de carbono ou qualquer outro composto orgânico ou inorgânico já conhecidos, ou novos compostos orgânicos produzidos utilizando técnicas de modelação molecular e obtidos por síntese química ou bioquímica, sendo essas técnicas conhecidas pelos peritos na técnica.

Os ditos compostos selecionados podem ser utilizados para modular a replicação celular de circovírus MAP e, assim, para controlar a infecção por este vírus. Os métodos

para a determinação das ditas modulações são bem conhecidos para os peritos na técnica.

Esta modulação pode ser obtida por exemplo por um agente capaz de se ligar a uma proteína e, portanto, de inibir ou potenciar a sua atividade biológica, ou capaz de se ligar a uma proteína de envelope da superfície exterior do dito vírus e a bloquear a penetração do dito vírus na célula hospedeira ou de promover a ação do sistema imunitário do organismo infetado dirigida contra o dito vírus. Esta modulação pode também ser conseguida por um agente capaz de se ligar a uma sequência nucleotídica de um ADN do dito vírus e bloquear, por exemplo, a expressão de um polipéptido cuja atividade biológica ou estrutural é necessária para a replicação e proliferação do dito vírus de células hospedeiras a células hospedeiras no animal hospedeiro.

A descrição refere-se aos compostos que podem ser selecionados através de um método de acordo com a descrição.

A descrição também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um composto selecionado a partir dos seguintes compostos:

- a) uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição;
- b) um polipéptido de acordo com a descrição;
- c) um vetor, uma partícula viral ou uma célula transformada de acordo com a descrição;
- d) um anticorpo de acordo com a descrição;
- e) um composto capaz de ser selecionado através de um método de seleção de acordo com a descrição;

eventualmente em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável e, se adequado, com um ou mais adjuvantes da imunidade apropriados.

A descrição também se refere a uma composição imunogénica ou vacinal, caracterizada por compreender um composto selecionado a partir dos compostos seguintes:

- a) uma sequência nucleotídica de acordo com a descrição;
- b) um polipéptido de acordo com a descrição;
- c) um vetor ou uma partícula vírica de acordo com a descrição; e
- d) uma célula de acordo com a descrição;

A descrição refere-se ainda a uma composição vacinal de acordo com a invenção, caracterizado por compreender uma mistura dos dois compostos a) e b) acima, e por um dos ditos dois compostos se referir ao circovírus MAP de tipo A e o outro se referir ao circovírus MAP de tipo B.

Por composto relativo ao circovírus MAP do tipo A ou B, entende-se designar neste caso, respetivamente, um composto obtido a partir da sequência genómica de circovírus MAP do tipo A ou B.

A descrição refere-se uma composição imunogénica e/ou vacinal, caracterizada por compreender pelo menos um dos seguintes compostos:

- uma sequência nucleotídica SEQ ID N° 11, ID SEQ N° 12, ou um seu fragmento;
- um polipéptido de sequência SEQ ID N°: 14, um seu fragmento ou um fragmento do polipéptido da sequência SEQ ID N°. 15,
- um vetor, ou uma partícula viral que compreende uma sequência nucleotídica SEQ ID N° 11, ou um seu fragmento um fragmento da sequência SEQ ID n ° 12, ou
- uma célula transformada capaz de expressar um polipeptídeo de SEQ ID N°: 14, ID SEQ N° 15, ou um seu fragmento; ou
- uma mistura de pelo menos dois dos ditos compostos.

A descrição também compreende uma composição imunogénica e/ou vacinal de acordo com a descrição, caracterizada por a referida mistura compreender, pelo menos, dois dos ditos compostos como um produto de combinação para utilização simultânea, separada ou escalonada no tempo, para a prevenção ou tratamento de

infecções por um circovírus MAP, especialmente do tipo B.

Numa forma de realização preferida, a composição vacinal de acordo com a invenção compreende misturar os seguintes compostos:

- um plasmídeo pcADN3 contendo um ácido nucleico de sequência SEQ ID N° 11;
- um plasmídeo pcADN3 contendo um ácido nucleico de sequência SEQ ID N° 12;
- um plasmídeo pcADN3 contendo um ácido nucleico que codifica a proteína GM-CSF;
- um baculovírus recombinante contendo um ácido nucleico de sequência SEQ ID N° 11;
- um baculovírus recombinante contendo um ácido nucleico de sequência SEQ ID N° 12; e
- se adequado, um adjuvante da imunidade adequado, em particular o adjuvante AIF<sup>TM</sup>.

A descrição também proporciona uma composição farmacêutica, de acordo com a descrição, para a prevenção ou tratamento de infecção por um circovírus MAP.

A descrição também proporciona uma composição farmacêutica, de acordo com a descrição, para a prevenção ou tratamento de infecção por um circovírus MAP do tipo B. A descrição também se refere à utilização de uma composição de acordo com a descrição para a preparação de um medicamento para a prevenção ou o tratamento de uma infecção por um circovírus MAP, de preferência pelo circovírus MAP do tipo B.

Noutro aspeto, a descrição tem por objeto um vetor, uma partícula viral ou uma célula de acordo com a descrição, para o tratamento e/ou prevenção de uma doença por terapia génica.

Finalmente, a descrição compreende a utilização de um vetor, uma partícula viral ou uma célula, de acordo com a descrição, para a preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença por terapia génica.

Os polipéptidos da descrição das composições imunogénicas ou vacinais de acordo com a invenção que podem ser selecionados por técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade, tais como, por exemplo, a capacidade dos ditos polipéptidos de estimular as células T, o que resulta por exemplo, na sua proliferação ou na secreção de interleucinas, e que conduz à produção de anticorpos contra referidos os ditos polipéptidos.

Em porcos, tal como em ratinhos, aos quais se administra uma dose por peso da composição vacinal comparável com a dose utilizada no ser humano, a reação de anticorpos é avaliada através da extração do soro seguida por um estudo da formação de um complexo entre os anticorpos presente no soro e o antigénio da composição vacinal, de acordo com as técnicas habituais.

As composições farmacêuticas de acordo com a descrição conterão uma quantidade eficaz dos compostos da descrição, ou seja, uma quantidade suficiente do dito ou dos ditos compostos para se obter o efeito desejado, tal como, por exemplo, a modulação da replicação celular de circovírus MAP. Os peritos na técnica saberão determinar esta quantidade, por exemplo, dependendo da idade e do peso do indivíduo a ser tratado, o progresso da doença, os possíveis efeitos secundários e através de um teste de avaliação dos efeitos obtidos sobre uma amostra da população, estes ensaios são conhecidos nestas áreas de aplicação.

De acordo com a descrição as ditas composições de vacinais estarão de preferência em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável e, se adequado, com um ou mais adjuvantes apropriados da imunidade.

Atualmente, vários tipos de vacinas estão disponíveis para proteger animais ou o ser humano contra doenças infecciosas: microrganismos vivos atenuados (*M. bovis* - BCG para tuberculose), microrganismos inativados (vírus da

gripe), extratos acelulares (*Bordetella pertussis* para a tosse convulsa), proteínas recombinantes (antigénio de superfície do vírus da hepatite B), polissacarídeos (pneumococos). As vacinas preparadas a partir de péptidos sintéticos ou de microrganismos geneticamente modificados que expressam antigénios heterólogos estão a ser testadas. Ainda mais recentemente, os ADNs plasmídicos recombinantes que transportam genes que codificam antigénios protetores foram propostos como uma estratégia de vacinação alternativa. Este tipo de vacinação é realizada com um plasmídeo particular, derivado de um plasmídeo de *E. coli*, que não se replica *in vivo* e que codifica apenas a proteína vírica. Os animais foram imunizados injetando simplesmente o ADN plasmídico no músculo. Esta técnica conduz a expressão da proteína vírica *in situ* e a uma resposta imunitária de tipo celular (CTL) e humoral (anticorpos). Esta dupla indução da resposta imunitária é uma das principais vantagens da técnica de vacinação com ADN nu.

As composições vacinais que compreendem sequências nucleotídicas ou vetores nos quais são inseridas as ditas sequências, são particularmente descritas no pedido de patente internacional N.º WO 90/11092 e também no pedido de patente internacional N.º WO 95/11307.

A sequência nucleotídica que constitui a composição vacinal, de acordo com a descrição pode ser injetada no hospedeiro, depois de ter sido acoplada a compostos que promovem a penetração deste polinucleótido dentro da célula ou o seu transporte para o núcleo da célula. Os conjugados resultantes podem ser encapsulados em micropartículas poliméricas, como descrito no pedido de patente internacional N.º WO 94/27238 (Medisorb Technologies International).

De acordo com uma outra forma de realização da composição vacinal da invenção, a sequência nucleotídica, preferencialmente um ADN, é complexada com DEAE-dextrano

(Pagano *et al.*, 1967) ou com proteínas nucleares (Kaneda *et al.* 1989), com lípidos (Felgner *et al.* 1987) ou encapsulada em lipossomas (Fraley *et al.* 1980) ou introduzido na forma de um gel que facilita a sua transfeção dentro das células (Midoux *et al.*, 1993, Pastore *et al.*, 1994). O polinucleótido ou vetor da invenção pode também ser suspenso numa solução tampão ou estar associado com lipossomas.

De forma vantajosa, uma tal vacina vai ser preparado de acordo com a técnica descrita por Tacson *et al.* ou Huygen *et al.* em 1996 ou de acordo com a técnica descrita por Davis *et al.* no Pedido Internacional N ° WO 95/11307.

A dita vacina também pode ser preparada na forma de uma composição contendo um vetor tal como descrito, sob o controlo de elementos reguladores que permitem a sua expressão em humanos ou animais. Ele pode por exemplo ser usado como vetor de expressão *in vivo* do antigénio polipeptídico de interesse, o plasmídeo pcADN3 ou o plasmídeo pcDNA1/neo, ambos comercializados pela Invitrogen (R & D Systems, Abingdon, Reino Unido). Também se pode utilizar o plasmídeo VIJns.tPA, descrito por Shiver *et al.* 1995. A dita vacina compreenderá vantajosamente além do vetor recombinante, uma solução salina, por exemplo uma solução de cloreto de sódio.

Por "veículo farmacêuticamente aceitável", entende-se um composto ou combinação de compostos que entram numa composição farmacêutica ou vacinal não provoca reações secundárias e permite, por exemplo, facilitar a administração do composto ativo, o aumento da sua vida e/ou da sua eficácia no organismo, o aumento da sua solubilidade em solução, ou a melhoria da sua conservação. Estes veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos e podem ser adaptado por um perito na especialidade, dependendo da natureza e do modo de administração do composto ativo escolhido.

No que diz respeito às formulações vacinais, estas podem incluir adjuvantes da imunidade apropriados que são conhecidos pelos peritos na especialidade, tais como hidróxido de alumínio, um representante da família dos péptidos de muramilo, tais como os derivados peptídicos de N-acetil-muramilo, um lisado bacteriano, ou adjuvante incompleto de Freund.

Estes compostos podem ser administrados por via sistêmica, em particular por via intravenosa, intramuscular, intradérmica ou subcutânea, ou por via oral. Mais preferencialmente, a composição de vacina que compreende polipéptidos de acordo com a invenção será administrada por via intramuscular, através de dieta ou por nebulização repetidamente, de maneira espaçada ao longo do tempo.

Os modos de administração, as doses e formas farmacêuticas podem ser determinadas de acordo com critérios geralmente tidos em conta para determinar um tratamento adequado a um animal, tais como a idade ou o peso, a gravidade da condição, tolerabilidade e os efeitos secundários observados.

A presente descrição também tem como objetivo a utilização de sequências nucleotídicas de circovírus MAP de acordo com a descrição, para a construção de vetores retrovirais autorreplicativos e aplicações terapêuticas das mesmas, em particular no campo da terapia génica humana *in vivo*.

A viabilidade da terapia genética em humanos está bem estabelecida e refere-se a muitas aplicações terapêuticas, tais como as doenças genéticas, doenças infecciosas e cancros. Muitos documentos da técnica anterior descrevem como implementar uma terapia génica, em particular por meio de vetores virais. Em geral, os vetores são obtidos por deleção de pelo menos uma parte dos genes virais, que são substituídos pelos genes de interesse terapêutico. Tais



vetores podem ser propagados numa linha celular de complementação, que fornece em trans as funções virais deletadas para gerar uma partícula de vetor viral para a replicação defeituosa, mas que pode infectar uma célula hospedeira. Atualmente, os vetores retrovirais são os mais utilizados e os seus modos de infecção estão amplamente descritos na literatura disponível para os peritos na especialidade.

O princípio da terapia génica é a entrega de um gene funcional, o referido gene de interesse, cujo ARN ou a proteína correspondente produzirá o efeito bioquímico desejado nas células ou tecidos alvo. Por um lado, a inserção de genes permite a expressão prolongada de moléculas complexas e instáveis prolongados, tais como ARN ou proteínas que podem ser extremamente difíceis ou impossíveis de obter ou de administrar diretamente. Além disso, a inserção controlada do gene desejado no interior das células específicas podem regular o produto de expressão nos tecidos alvo. Para isso, é necessário ser capaz de inserir o gene terapêutico desejado no interior de células específicas selecionadas e, portanto, dispor de um método de inserção capaz de direcionar especificamente as células ou os tecidos selecionados.

Entre os métodos de inserção de genes, como por exemplo a microinjeção, em particular a injeção de ADN plasmídico *nu* (Derse, D. *et al.* De 1995, e Zhao, TM *et al.* 1, 1996), eletroporação, a recombinação homóloga, a utilização de partículas virais, tais como o retrovírus, está amplamente difundida. No entanto, quando aplicados, *in vivo*, os sistemas de transferência de genes de tipo retroviral recombinante, apresentam tanto baixa infeciosidade (insuficiente concentração de partículas virais) e uma falta de especificidade em relação a células alvo selecionadas.

A forma de realização de vetores virais específicos

das células que têm um tropismo específico de tecido e a transdução do gene de interesse pode ser convenientemente levada a cabo por células alvo, por exemplo, através da fusão de um ligando específico de células hospedeiras alvo na porção N-terminal de uma proteína de superfície do envelope do circovírus MAP. Estes incluem por exemplo a construção de partículas retrovirais contendo a molécula CD4 na superfície do envelope, de modo a atingir as células humanas infectadas com o vírus VIH (Young *et al.* J.A.T. Science 1990, 250, 1421-1423), as partículas virais que apresentem uma hormona peptídica fundida com uma proteína de envelope para infectar especificamente as células que expressam o recetor correspondente (Kasahara, N. *et al.* Sciences 1994, 266, 1373-1376) ou, alternativamente, de partículas virais que apresentam um polipéptido fundido capaz de se ligar ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Cosset, FL *et al.* J. of Virology 1995, 69, 10, 6314-6322). Noutra abordagem, os fragmentos individuais de anticorpos contra os antígenos de superfície das células alvo são introduzidos através de fusão na porção N-terminal da proteína do envelope (VALSESIA-WITTMAN, S. *et al.* J. of Virology 1996, 70, 3, 2059-2064; TEARINA CHU, e T. H. *et al.*, J. of Virology 1997, 71, 1, 720-725).

No sentido da presente descrição, um gene de interesse de utilização na descrição pode ser obtido a partir de um organismo eucariótica, procariótica ou de um vírus por qualquer técnica convencional. Ele é de preferência capaz de produzir um produto de expressão tendo um efeito terapêutico e pode ser um produto homólogo à célula hospedeira, ou, alternativamente, heterólogo. No contexto da presente descrição, um gene de interesse pode codificar um produto (i) intracelular, (ii) presente na superfície da membrana da célula hospedeira ou (iii) segregado fora da célula hospedeira. Ele pode, pois, compreender elementos

adicionais, tais como, por exemplo, uma sequência que codifica um sinal de secreção. Estes sinais são conhecidos pelos peritos na especialidade.

De acordo com os objetivos da presente invenção, um gene de interesse pode codificar uma proteína isolada correspondente a toda ou parte de uma proteína nativa como encontrada na natureza. Ela também pode ser uma proteína quimérica, por exemplo, a partir dos polipéptidos de fusão de várias origens ou de um mutante com propriedades biológicas melhoradas e/ou modificadas. Um tal mutante pode ser obtido por meio de técnicas de biologia habituais, por substituição, deleção e/ou adição de um ou mais resíduos de aminoácidos.

É particularmente preferida a utilização de um gene de interesse terapêutico codifica um produto de expressão capaz de inibir ou atrasar o estabelecimento e/ou o desenvolvimento de uma doença genética ou adquirida. Um vetor tal como descrito destina-se particularmente para a prevenção ou o tratamento da fibrose cística, da hemofilia A ou B, da distrofia muscular de Duchenne ou Becker, do cancro, da SIDA, e de bactérias ou outras doenças infecciosas causadas por um organismo patogénico: vírus, bactérias, parasitas ou prião. Os genes de interesse utilizados no presente descrição são os que codificam, por exemplo, as seguintes proteínas:

- uma citocina e em particular uma interleucina, interferão, fator de necrose do tecido e um fator de crescimento e em particular hematopoiética (G-CSF, GM-CSF),
- um fator ou cofator envolvido na coagulação e em particular o fator VIII, o fator de von Willebrand, a antitrombina III, proteína C, trombina e hirudina,
- uma enzima ou um inibidor de enzima, tais como os inibidores de proteases virais,
- um produto de expressão de um gene suicida tal como a

- timidina cinase do vírus HSV (vírus do herpes) de tipo 1,
- um ativador ou inibidor de canais iônicos,
  - uma proteína cuja ausência, modificação ou desregulação da expressão é responsável por uma doença genética, tal como a proteína CFTR, a distrofina ou minidistrofina, a insulina, a ADA (adenosina deaminase) glucocerebrosidase e fenilhidroxilase,
  - uma proteína capaz de inibir a iniciação ou progressão do cancro, tal como produtos de expressão dos genes supressores de tumores, como os genes p53 e Rb,
  - uma proteína capaz de estimular uma resposta imunitária ou um anticorpo, e
  - uma proteína capaz de inibir uma infecção viral, ou o seu desenvolvimento, tal como epítomos antigénicos do vírus em questão ou variantes alteradas de proteínas virais capazes de competir com as proteínas virais nativas relevantes.

A descrição refere-se, portanto, aos vetores caracterizados por compreenderem uma sequência nucleotídica de circovírus MAP de acordo com a descrição, e por compreenderem ainda um gene de interesse.

A presente descrição também se refere a partículas virais geradas a partir do dito vetor de acordo com a descrição. Refere-se ainda a métodos para a preparação de partículas virais de acordo com a descrição, caracterizadas por utilizarem um vetor de acordo com a descrição, incluindo as partículas semelhantes a vírus (VLP, *Virus-Like Particles*).

A descrição também tem como objetivo células animais transfectadas com um vetor de acordo com a descrição.

Também estão incluídos na descrição de células animais, em particular mamíferos, as células infectadas com uma partícula viral de acordo com a descrição.

A presente descrição refere-se também a um vetor, uma partícula viral ou uma célula de acordo com a descrição,

para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença genética ou de uma doença adquirida, tal como cancro ou uma doença infecciosa. A descrição também se refere a uma composição farmacêutica que compreende, como a título de agente terapêutico ou profilático um vetor ou uma célula de acordo com a descrição, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Outras características e vantagens da invenção serão mais claras a partir dos exemplos e figuras seguintes:

Legendas das figuras:

Figura 1: Esquema experimental que permitiu alcançar o isolamento e a identificação do circovírus associado ao MAP do tipo A e B.

Ensaio 1: reprodução experimental do MAP por inoculação de órgãos triturados de porcos de criações atingidas por MAP.

Ensaio 2: reprodução experimental do MAP.

Ensaio 3: reprodução experimental do MAP.

Ensaio 4: ausência de reprodução experimental do MAP.

Figura 2: Organização do genoma do circovírus associado ao MAP do tipo A (PCVA)

- cadeia de polaridade (+) (SEQ ID N°1);
- cadeia de polaridade (-) (SEQ ID N°2, representada seguindo a orientação 3' → 5');
- sequências de aminoácidos das proteínas codificadas por duas cadeias de ADN das três grelhas de leitura possíveis.

Figura 3: Alinhamento da sequência nucleotídica SEQ ID N° 1 do circovírus MAP do tipo A (PCVA) e dos circovírus estirpe MEEHAN e estirpe MANKERTZ das linhas celulares porcinas.

Figura 4: Alinhamento da sequência de aminoácidos SEQ ID N° 6 do polipéptido codificado pela sequência nucleotídica SEQ ID N°3 (ORF1) do circovírus MAP do tipo A (PCVA) e das sequências nucleotídicas correspondentes

dos circovírus estirpe MEEHAN e estirpe MANKERTZ das linhas celulares porcinas.

Figura 5: Alinhamento da sequência de aminoácidos SEQ ID N° 7 do polipéptido codificado pela sequência nucleotídica SEQ ID N°4 (ORF2) do circovírus MAP do tipo A (PCVA) e das sequências nucleotídicas correspondentes dos circovírus estirpe MEEHAN e estirpe MANKERTZ das linhas celulares porcinas.

Figura 6: Alinhamento da sequência de aminoácidos SEQ ID N° 8 do polipéptido codificado pela sequência nucleotídica SEQ ID N°5 (ORF3) do circovírus MAP do tipo A (PCVA) e das sequências nucleotídicas correspondentes dos circovírus estirpe MEEHAN e estirpe MANKERTZ das linhas celulares porcinas.

Figura 7: Análise por "Western-Blot" das proteínas recombinantes do circovírus MAP do tipo A (PCVA). As análises foram realizadas em extratos celulares de células Sf9 obtidas após infecção pelo baculovírus recombinante PCV ORF 1.

Figura 8: Organização do genoma do circovírus associado ao MAP de tipo B (PCVB)

- cadeia de polaridade (+) (SEQ ID N°9);
- cadeia de polaridade (-) (SEQ ID N°10, representada seguindo a orientação 3' → 5');
- sequências de aminoácidos das proteínas codificadas por duas cadeias de ADN nas três grelhas de leitura possíveis.

Figura 9: Evolução do ganho médio diário (GMQ, do francês *gains moyens quotidiens*) de porcos de criação atingidos pela doença do emagrecimento do leitão (MAP ou DFL), colocados nas condições experimentais.

Figura 10: GMQ comparado para os 3 lotes de porcos (F1, F3 e F4) calculado ao longo de um período de 28 dias, após teste de vacinação.

Figura 11: Hipertermia superior a 41 °C, expressa em

percentagem comparada para os 3 lotes de porcos (F1, F3 e F4) calculada por semana ao longo de um período de 28 dias, após teste de vacinação.

Figura 12: Membranas dos *spots* peptídicos correspondentes às ORF2 reveladas com auxílio de um soro de porco infectado, proveniente de uma criação convencional.

Os números de péptidos específicos do circovírus de tipo B assim como dos seus homólogos não reativos (tipo A) são indicados a negrito.

Os péptidos imunogénicos não específicos são indicados em itálico.

Figura 13: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pela ORF2 do circovírus MAP de tipo A e pela ORF2 do circovírus MAP do tipo B. A posição de 4 péptidos correspondente a epítomos específicos do circovírus MAP do tipo B é indicada na sequência correspondente com um traço grosso, o homólogo na sequência do circovírus MAP do tipo é igualmente indicado com um traço simples.

**EXEMPLOS** (os exemplos 1 a 5 são ilustrativos)

EXEMPLO 1: Clonagem, sequenciação e caracterização do circovírus MAP do tipo A (PCVA)

#### 1- Procedimentos experimentais

Reprodução experimental da infeção e da sua síndrome (veja-se a Figura 1). Foi realizado um primeiro teste com porcos provenientes de uma criação de muito bom porte mas atingida pela doença do emagrecimento do leitão (MAP) ou denominada igualmente DFP (Definhamento Fatal do Leitão). Testes de contacto com porcos EOPS mostraram uma transferência de contaminante(s) traduzindo-se por uma patologia complexa associando a hipertermia, o desacelerar do crescimento, diarreia e conjuntivite. O vírus SDRP (síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, doença infecciosa devida a um arterivírus) foi rapidamente isolado a partir dos porcos da criação e dos porcos de contacto. O

conjunto dos sinais clínicos poderia ter sido atribuído à presença do vírus SDRP. No entanto, dois porcos de criação apresentaram sinais de DFP sem que o vírus SDRP tenha sido isolado. As análises histológicas e fórmulas sanguíneas mostraram no entanto que estes porcos padeciam de um processo infeccioso de origem viral.

Num segundo teste, porcos EOPS de 8 semanas foram inoculados por via intratraqueal com órgãos triturados provenientes de dois porcos de criações atingidas com DFP. Os porcos inoculados apresentaram hipertermia 8 a 9 dias após a infeção, e o seu crescimento desacelerou. Outros porcos EOPS, colocados em contacto, apresentaram sinais semelhantes, atenuados 30 dias após a prova inicial. Nenhuma seroconversão relativamente a uma estirpe europeia ou canadiana do vírus SDRP foi registada nestes animais.

Um terceiro teste permitiu reproduzir a síndrome a partir de recolhas efetuadas nos porcos do segundo teste.

#### Conclusão

A síndrome é reproduzida nas condições experimentais. É determinada por pelo menos um agente infeccioso transmissível por contacto direto. As constantes clínicas são uma hipertermia por vezes elevada (superior ou igual a 41,5 °C) que se desenvolve 8 a 10 dias após a infeção. Pode ser observado um desacelerar do crescimento. As outras manifestações são uma inversão da fórmula sanguínea (inversão em relação à razão linfócito/polinuclear de 70/30 a 30/70) e lesões frequentes nos gânglios, especialmente aqueles que drenam o aparelho respiratório (hipertrofia ganglionar, perda de estrutura com necrose e infiltração por células mononucleares ou polinucleares gigantes).

#### 2- Estudos em laboratório

Diversos suportes celulares incluindo células de rim de porco primárias ou em linhagem, células de testículo de porco, células de rim de macaco, linfócitos de porco, macrófagos alveolares de porco, monócitos do sangue em



circulação, foram utilizados para evidenciar a eventual presença de um vírus. Não foi evidenciado qualquer efeito citopático nestas células. Pelo contrário, a utilização de um soro de porco doente após infecção experimental permitiu revelar um antigénio intracelular nos monócitos, nos macrófagos e em cerca de 10% das células de rim de porco (RP) infetadas com os órgãos triturados. Esta revelação indireta foi feita em cinética a diferentes tempos de cultura. Daqui resulta que o antigénio aparece inicialmente no núcleo das células infetadas antes de se propagar no citoplasma. As passagens sucessivas em cultura celular não permitiram amplificar o sinal.

Em microscopia eletrónica aplicada à matéria triturada de órgãos, visualizaram-se partículas esféricas marcadas especificamente pelo soro de porcos doentes, infetados nas condições experimentais. A dimensão destas partículas é estimada de 20 nm.

Após duas passagens desta matéria triturada de órgãos em linfócitos de porco e depois três passagens em células de rim ou de testículo de porco, desenvolveu-se e foi amplificado um efeito citopático. No microscópio eletrónico foi visualizado um adenovírus que, nas condições experimentais, não reproduz o DFL (nota-se apenas um pico de hipertermia 24 a 48 horas após a infecção, e depois mais nada).

Puderam ser evidenciadas bandas de ADN em certas amostragens de porcos infetados nas condições experimentais e que apresentaram sinais da doença (resultados não representados). Existe uma certa correspondência entre as amostragens que dão um resultado positivo em cultura celular e aqueles que apresentam uma banda de ADN.

#### Conclusão

Pelo menos dois tipos de vírus foram evidenciados na matéria triturada de órgãos de porcos doentes de DFP. Um é o adenovírus, mas não produz por si só a doença. O outro

tipo de vírus é um circovírus e está associado ao DFP. Este circovírus, do qual foram isolados e sequenciados dois tipos, aqui de seguida denominados circovírus MAP de tipo A (ou PCVA) e circovírus MAP do tipo B (ou PCVB) apresentam mutações em relação às sequências conhecidas de circovírus não patogénicos para o porco.

### 3- Clonagem e sequenciação do ADN do circovírus MAP do tipo A

A extração da forma replicativa de ADN (RF), clivagem pela enzima Kpn I e amplificação por um par de iniciadores que flanqueiam o local de restrição Kpn I. Sequenciação das duas cadeias pelo menos duas vezes pelo método de Sanger.

A sequência nucleica da cadeia de polaridade (+) do genoma do circovírus MAP de tipo A (ou PCVA), estirpe DFL, é representada pela sequência SEQ ID N° 1 na lista das sequências, sendo a sequência nucleica da cadeia de polaridade (-) do genoma do circovírus MAP do tipo A (ou PCVA) pela sequência nucleica 3'→5' da figura 3 ou pela sequência SEQ ID N° 2 (representada seguindo a orientação 5'→3') na lista de sequências.

As sequências de aminoácidos SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 e SEQ ID N° 8 da lista de sequências que representam, respetivamente, as sequências das proteínas codificadas pelas sequências nucleicas das 3 grelhas de leitura aberta SEQ ID N° 3 (ORF1), correspondente à proteína REP, SEQ ID N° 4 (ORF2) e SEQ ID N° 5 (ORF3), determinados a partir da sequência SEQ ID N° 1 da cadeia de polaridade (+) ou da sequência SEQ ID N° 2 da cadeia de polaridade (-) do genoma do circovírus MAP do tipo A.

### 4- Comparação das sequências nucleotídicas e de aminoácidos do circovírus MAP do tipo A (ou associado a MAP) obtidas com as sequências correspondentes de circovírus MEEHAN e MANKERTZ de linhas celulares porcinas

Utilização do programa informático de análise de sequências de ADN, DNASIS.

Sequências dos oligonucleótidos utilizados como iniciadores ou sondas nos processos de detecção e ou de identificação

1. detecção específica do circovírus MAP do tipo A:  
     iniciador PCV 5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';  
     iniciador PCV 10: 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';
2. detecção específica do circovírus das linhas celulares:  
     iniciador PCV 5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';  
     iniciador MEE1: 5' TGG AAT GTT AAC TAC ATC AA 3';
3. detecção diferencial:  
     os pares de iniciadores utilizados são aqueles por exemplo descritos nos parágrafos 1 e 2 acima;
4. detecção das formas replicativas RF (*replicative forms*) circulares monoméricas:  
     iniciador PCV 5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';  
     iniciador PCV 6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';
5. detecção dos vetores contendo dímeros em tandem:  
     dímero Nar:  
         iniciador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';  
         iniciador PCV 5: 5'GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';  
         dímero Kpn: iniciador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';  
         iniciador PCV 6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';
6. detecção diferencial:  
     os pares de iniciadores são aqueles por exemplo descritos nos parágrafos 4 e 5 acima.

Os processos utilizando os pares de iniciadores descritos nos parágrafos 4 e 5 são particularmente interessantes para detetar de forma diferencial as formas monoméricas circulares de formas replicativas específicas do virião ou do ADN em replicação e as formas diméricas encontradas nas construções moleculares ditas em tandem.

As construções em tandem do genoma viral (dímeros) tais como as construções utilizadas para a preparação do vetor pBS KS+ Tandem PCV Kpn 1, depositado na CNCM com o número I-1891, a 3 de julho de 1997 (*E. coli* transformada

pelo referido vetor) são muito interessantes para a sua utilização nos métodos de produção em quantidade suficiente de um inóculo constituído por ADN, destinado à produção de vírus e isto na ausência de protocolo satisfatório de produção de vírus em sistema celular. Os referidos métodos de produção utilizam estas construções em série do genoma viral permitirão estudar por mutação os fatores de virulência e por consequência poderão ser utilizados para o fabrico de uma coleção de vírus com as mutações indicadas na construção dos vetores que apresentarão o tropismo e a virulência apropriados. Estes vetores de estrutura autorreplicativa apresentam propriedades procuradas em transferência de genes, especialmente para as suas aplicações em terapia génica, e em vacinologia.

#### Análise por "Western-Blot" das proteínas recombinantes do circovírus MAP do tipo A

Os resultados foram obtidos utilizando um antissoro específico do circovírus MAP produzido aquando do ensaio 1 (veja-se a figura 1).

#### Tipo de produtos analisados

As análises foram realizadas em extratos celulares de células Sf9 obtidas após infeção pelo baculovírus recombinante PCV ORF 1.

A cultura das células Sf9 foi realizada numa caixa de Petri de 25 cm<sup>2</sup> segundo os métodos de cultura convencionais para estas células. Após centrifugação, os sedimentos celulares são retomados por 300 µl de tampão PBS (tampão fosfato salino).

#### Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese é realizada dos extratos celulares de células Sf9 obtidos anteriormente em 5 amostras (veja-se o quadro 1 abaixo) nas seguintes condições:

% gel de poliacrilamida: 8%; Condições: desnaturantes  
Voltagem: 80 V; Duração: 135 minutos

Quadro 1: Natureza das amostras submetidas à eletroforese

| N° de poço                                                                                                                                                                                                                     | 1             | 2             | 3             | 4             | 5             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Depósitos                                                                                                                                                                                                                      | PM<br>Rainbow | Raoul 24<br>h | Raoul<br>48 h | Raoul 72<br>h | Raoul<br>96 h |
| µl amostra                                                                                                                                                                                                                     | 10            | 15            | 15            | 15            | 15            |
| µl Laemli<br>4X                                                                                                                                                                                                                | 0             | 5             | 5             | 5             | 5             |
| Legendas do quadro 1:<br>Laemli 4X: tampão de carga<br>PM Rainbow: marcadores de massa molecular (35, 52, 77, 107, 160 e 250 kDa)<br>Raoul 24 h, 48 h, 72 h e 96 h: produtos de expressão da ORF1 do circovírus MAP do tipo A. |               |               |               |               |               |

### Western-blot

Após eletroforese, as bandas obtidas nos diferentes poços são transferidas numa membrana de nitrocelulose durante 1 h a 100 V num tampão TGM (Tris-glicina-metanol).

O *Western-blot* é realizado nas seguintes condições:

1) Saturação por uma solução contendo 5% de leite desnatado; 0,05% de Tween 20 num tampão TBS 1X (Tris buffer saline) durante 30 minutos.

2) 1° anticorpo:

10 ml de anticorpo anti-circovírus MAP do tipo A são adicionados diluídos a 1/100, e depois o meio reacional é incubado uma noite a 4 °C. São efetuadas três lavagens de 10 min em TBS 1X.

3) 2° anticorpo:

10 ml de anticorpo P164 de coelho anti-imunoglobulinas de porco, acoplados à peroxidase (Dakopath) são adicionados diluídos a 1/100, depois o meio reacional é incubado 3 horas a 37 °C. São efetuadas três lavagens 10 min em TBS 1X.

4) Revelação

Utiliza-se para a revelação substrato 4-cloro-1-

naftol, na presença de água oxigenada.

## Resultados

Os resultados são representados na figura 7.

Cinética de aparecimento dos anticorpos específicos para a proteína recombinante REP do circovírus MAP do tipo A expressa em baculovírus após infecção dos porcos pelo circovírus MAP do tipo A (ensaio 4, veja-se a figura 1)

Após infecção dos porcos, é recolhida uma amostra de soro de cada um dos porcos infetados em diferentes períodos expressos no quadro pela data de recolha (aqui efetuada no mesmo ano) e depois é analisada por "Western-blot".

A revelação dos anticorpos específicos é realizada do modo descrito anteriormente.

Os resultados obtidos são representados pelo quadro 2 abaixo.

<sup>2</sup>Quadro 2: Cinética de aparecimento dos anticorpos específicos

[illegible]

Legendas do quadro 2:

A3 Controlo: animais controlo não infetados;

B2 Infec. RP+: animais infectados com células de rim de porco (RP) contendo o circovírus;

Neg.: negativo;

+, ++, +++: escala de intensidade da reação positiva;

10/06, 16/06, 23/06, 01/07, 08/07, 15/07, 21/07: datas expressas em dia/mês nas quais foram efetuadas as diferentes recolhas de soro.

EXEMPLO 2: Clonagem, sequenciação e caracterização do circovírus MAP tipo B (PCVB)

As técnicas utilizadas para a clonagem, a sequenciação e a caracterização do circovírus MAP do tipo B (PCVB) são aquelas utilizadas no exemplo 1 acima para o circovírus MAP tipo A (PCVA).

A sequência nucleica da cadeia de polaridade (+) do genoma do circovírus MAP de tipo B (ou PCVB), é representada pela sequência SEQ ID N° 9 na lista das sequências, sendo a sequência nucleica da cadeia de polaridade (-) do genoma do circovírus MAP do tipo B (ou PCVB) pela sequência nucleica 3'→5' da figura 8 ou pela sequência SEQ ID N° 10 (representada seguindo a orientação 5'→3') na lista de sequências.

As sequências de aminoácidos SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15 e SEQ ID N° 16 da lista de sequências que representam, respetivamente, as sequências das proteínas codificadas pelas sequências nucleicas das 3 grelhas de leitura aberta SEQ ID N° 11 (ORF'1), correspondente à proteína REP, SEQ ID N° 12 (ORF'2) e SEQ ID N° 13 (ORF'3), determinados a partir da sequência SEQ ID N° 9 da cadeia de polaridade (+) ou da sequência SEQ ID N° 10 da cadeia de polaridade (-) do genoma do circovírus MAP do tipo B.

EXEMPLO 3: Análise comparativa das sequências nucleotídicas (ORF1, ORF2 e genómica) e das sequências de aminoácidos codificadas pela ORF1 e a ORF2 dos circovírus MAP do tipo A (PCVA) e de tipo B (PCVB)

Os resultados expressos em % de homologia são representados nos quadros 3 e 4 seguintes.

Quadro 3: Análise comparada das sequências de aminoácidos

| % de homologia | ORF1 | ORF2 |
|----------------|------|------|
| PCVA/PCVB      | 80,4 | 56,2 |

Quadro 4: Análise comparada das sequências nucleotídicas

| % de homologia | Genómica | ORF1 | ORF2 | Resto |
|----------------|----------|------|------|-------|
| PCVA/PCVB      | 70,4     | 80,4 | 60,1 | 66,1  |

#### EXEMPLO 4: Observação da doença e reprodução da doença nas condições experimentais

##### a) Ensaio N° 1: Observação da doença

O objetivo é selecionar animais de criação no início da doença e colocá-los em condições experimentais para seguir a evolução da patologia e descrever as manifestações clínicas. Este primeiro ensaio foi efetuado em 3 porcos de criação com 10 semanas de idade dos quais 2 já estavam doentes (atingidos por definhamento), e em 3 outros porcos com 13 semanas de idade, não apresentando quaisquer sinais de doença. A observação clínica prolongou-se ao longo de um período de 37 dias. Dois porcos de 10 semanas rapidamente definharam (porco 1 e 2, figura 9) e tiveram de ser sacrificados 5 e 6 dias após a sua chegada. Apenas um apresentou hipertermia em 5 dias e diarreia. Dois outros porcos apresentaram dispneia e tosse dos quais um entre outros apresentou hipertermia, superior a 41°C, os primeiros dois dias da sua estadia. Um outro porco teve um crescimento desacelerado na segunda semana (porco 6, figura 9), sem qualquer outro sinal clínico se tenha revelado. No plano das lesões, 5 porcos em 6 apresentaram lesões macroscópicas de pneumonia em fase de hepatização cinzenta, apresentando o sexto lesões cicatrizadas no pulmão.

##### b) Ensaio N° 2: Reprodução da doença a partir de inóculos preparados em porcos de criação.

Os dois porcos doentes no ensaio 1 serviram para preparar inóculos que foram testados no ensaio 2 em porcos isentos de organismos patogénicos específicos (EOPS, SPF na versão anglo-saxónica). Os porcos EOPS tinham uma idade de 9 semanas no momento da inoculação. Os resultados clínicos e lesionais são apresentados no quadro 5.



**Quadro 5: recapitulação das medições efetuadas aquando das reproduções experimentais (entre parêntesis são apresentados os valores dos animais de controlo, os valores sublinhados indicam uma diferença entre animais infetados e animais controlo)**

| Medida                                | Ensaio               | 2                      | 3                                                                             | 4                                                                             | 5                                                                             | 6                                                                             | 7             |
|---------------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Estatuto dos porcos                   |                      | EDPS CNEVA             | EDPS terreno                                                                  | EDPS CNEVA                                                                    | EDPS CNEVA                                                                    | Convencionais                                                                 | Convencionais |
| Idade                                 |                      | 9 semanas              | 6 semanas                                                                     | 5 semanas                                                                     | 5 semanas                                                                     | 5 semanas                                                                     | 6-7 semanas   |
| Número                                |                      | 4                      | 6                                                                             | 12                                                                            | 8                                                                             | 8                                                                             | 8             |
| Via de inoculação                     | Via intratraqueal    | Via intratraqueal      | Via intratraqueal + intratraqueal                                             | Via intratraqueal + intratraqueal                                             | Via intratraqueal + intratraqueal                                             | Via intratraqueal + intratraqueal                                             |               |
| Título inóculo por porco              | ND*                  | ND*                    | intramuscular 10 <sup>4,53</sup> TCID <sub>50</sub> por ml: 1 ml IM + 5 ml IT | intramuscular 10 <sup>4,53</sup> TCID <sub>50</sub> por ml: 1 ml IM + 5 ml IT | intramuscular 10 <sup>4,53</sup> TCID <sub>50</sub> por ml: 1 ml IM + 5 ml IT | intramuscular 10 <sup>4,53</sup> TCID <sub>50</sub> por ml: 1 ml IM + 5 ml IT |               |
| Início das hipertermias               | 10 dias pós-infecção | 9-13 dias pós-infecção | 12-13 dias pós-infecção                                                       | 9-14 dias pós-infecção                                                        | 8-12 dias pós-infecção                                                        | 12 dias pós-infecção                                                          |               |
| % de porcos com hipertermia**         | 100%                 | 83%                    | 92%                                                                           | 100%                                                                          | 75%                                                                           | 88%                                                                           |               |
| Nº de dias de hipertermia por porco** | 7                    | 4,5                    | 3,3                                                                           | 5,8                                                                           | 7,5                                                                           | 11,6                                                                          |               |
| Temperaturas máximas***               | 40,4 a 41,7 °C       | 40,6 a 42,3 °C         | 40,2 a 41,6 °C                                                                | 40,3 a 40,8 °C                                                                | 40,6 a 42 °C                                                                  | 40,2 a 41,9 °C                                                                |               |
| Hipertermia****% por semana           |                      |                        |                                                                               |                                                                               |                                                                               |                                                                               |               |
| S1                                    | 3,5 (3,5)            | 17 (36)                | 7 (5)                                                                         | 37 (7)                                                                        | 16 (17)                                                                       | 20 (28)                                                                       |               |
| S2                                    | 42 (3,5)             | 7 (13)                 | 13 (1)                                                                        | 21 (3)                                                                        | 52 (10)                                                                       | 37 (28)                                                                       |               |
| S3                                    | 35 (3,5)             | 33 (10)                | 28 (7)                                                                        | 62 (2)                                                                        | 34 (12)                                                                       | 79 (17)                                                                       |               |
| S4                                    | 21 (3,5)             | 28 (7)                 | 5 (0)                                                                         | 6 (3)                                                                         | 25 (22)                                                                       | 55 (3)                                                                        |               |
| GMO:                                  |                      |                        |                                                                               |                                                                               |                                                                               |                                                                               |               |
| S1                                    | 928 (1053)           | 417 (357)              | 564 (620)                                                                     | 650 (589)                                                                     | 401 (407)                                                                     | 509 (512)                                                                     |               |
| S2                                    | 678 (1028)           | 428 (617)              | 503 (718)                                                                     | 612 (584)                                                                     | 294 (514)                                                                     | 410 (310)                                                                     |               |
| S3                                    | 661 (1000)           | 771 (642)              | 381 (657)                                                                     | 520 (651)                                                                     | 375 (586)                                                                     | 435 (440)                                                                     |               |
| S4                                    | 786 (1100)           | 550 (657)              | 764 (778)                                                                     | 641 (696)                                                                     | 473 (610)                                                                     | 451 (681)                                                                     |               |
| Transmissão nos porcos por contactos  | Sim a 100%           | Sim a 75%              | Não testado                                                                   | Não testado                                                                   | Não testado                                                                   | Não testado                                                                   |               |
| % de lesões pulmonares                | 25                   | 75                     | 0                                                                             | 25                                                                            | 25                                                                            | 12                                                                            |               |
| % de lesões ganglionares              | 17                   | 33                     | 67                                                                            | 25                                                                            | 50                                                                            | 12                                                                            |               |



Neste ensaio, não houve nenhum definhamento, como muito uma desaceleração do crescimento à segunda, terceira ou quarta semana após infecção. Estes dados ilustram que certas condições de criação favorecem provavelmente a expressão da doença.

c) Ensaio N° 3 a N° 7: Reprodução dos ensaios experimentais

A multiplicação dos ensaios experimentais em porcos teve como objetivo dominar e melhor caracterizar o modelo experimental. O conjunto dos resultados é apresentado no quadro 5.

Nas condições experimentais, o MAP caracteriza-se assim por uma incubação longa, de 8 a 14 dias, com hipertermias francas durante 2 a 8 dias, uma diminuição do consumo alimentar e uma desaceleração do crescimento ponderal à segunda, terceira ou quarta semana pós-infecção. O quadro lesional associada a esta expressão clínica inclui no essencial, hipertrofias dos gânglios e lesões de pneumonia.

#### Conclusão

A otimização deste modelo experimental permite evidenciar de modo indiscutível o papel etiológico direto do circovírus MAP na doença. Além disso, este modelo é a ferramenta indispensável para a compreensão dos mecanismos patogénicos e o estudo de futuros candidatos a vacinas.

EXEMPLO 5: Evidenciação da eficácia protetora de composição de vacina preparada a partir de fragmentos nucleicos de sequência de circovírus MAP

1) Animais utilizados para o estudo

Leitões que apresentem a doença MAP, reproduzida nas condições experimentais descritas no parágrafo c) do Exemplo 4, foram utilizados num protocolo de avaliação da eficácia de composição para vacina compreendendo fragmentos nucleicos de sequência de circovírus MAP.

2) Composição vacinal testada e protocolo de vacinação

a) Componentes utilizados para o estudo

Os plasmídeos foram obtidos a partir do plasmídeo pcADN3 de INVITROGENE

- Plasmídeos pcADN3 ORF-

Estes plasmídeos são plasmídeos que não contêm qualquer inserção de ácido nucleico de circovírus MAP e são utilizados a título de plasmídeo controlo negativo.

- Plasmídeo pcADN3ORF1+ e plasmídeo pcADN3ORF2+

Os plasmídeos pcADN3ORF1+ e pcADN3ORF2+ são plasmídeos que contêm uma inserção de ácido nucleico da sequência do circovírus MAP do TIPO B, respetivamente uma inserção compreendendo o fragmento de ácido nucleico SEQ ID N° 11 (ORF'1) que codifica para a proteína Rep de sequência SEQ ID N° 14 e uma inserção que inclui o fragmento de ácido nucleico SEQ ID N° 12 (ORF'2) que codifica para a proteína de sequência SEQ ID N° 15, correspondente provavelmente à proteína de cápside, construções nucleicas estas que incluem o codão ATG de iniciação da sequência que codifica a proteína correspondente.

- Plasmídeo GMCSF+

O GM-CSF (fator estimulador de colónias de granulócitos/macrófagos) é uma citocina que intervém no desenvolvimento, na maturação e na ativação dos macrófagos, dos granulócitos e das células dendríticas apresentadoras de antígeno. Estima-se que o contributo genérico do GM-CSF na vacinação é uma ativação celular com especialmente o recrutamento e a diferenciação de células apresentadoras de antígeno.

Este plasmídeo pcADN3-GMCSF+ contém uma inserção de ácido nucleico que codifica para o fator estimulador de colónias granulócitos/macrófago, a proteína GM-CSF.

O gene que codifica para esta proteína GM-CSF foi clonado e sequenciado por Inumaru *et al.* (Immunol. Cell Biol., 1995, 73 (5), 474-476). O plasmídeo pcADN3-G;CSF+ foi obtido junto do Dr. B. Charley do INRA de Jouy-en-Josas

(78, França).

- Baculovírus recombinantes

Os baculovírus ditos ORF- são vírus que não contêm inserção compreendendo um fragmento de ácido nucleico capaz de expressar uma proteína do circovírus MAP.

Os baculovírus ditos ORF1+ (BAC ORF1+) ou ORF2+ (BAC ORF2+) são baculovírus recombinantes contendo respectivamente uma inserção contendo um fragmento de ácido nucleico SEQ ID N° 11 (ORF'1) e uma inserção contendo o fragmento de ácido nucleico SEQ ID N° 12 (ORF'2).

-Adjuvante

O adjuvante fornecido pela empresa Seppic filial de AIR LIQUIDE é o adjuvante correspondente à referência AIF SEPPIC.

b) Protocolo de vacinação

Leitões desmamados com 3 semanas de idade são repartidos em quatro lotes A, B, C e D contendo cada um 8 leitões.

Os lotes A, B e C, com 3 semanas de idade, recebem cada um uma primeira injeção (injeção M1) de 1 ml contendo 200 microgramas de plasmídeos (ADN nu) em PBS, pH: 7,2, por via intramuscular para cada um dos plasmídeos mencionados de seguida para cada lote, e depois, à idade de 5 semanas uma segunda injeção (injeção M2) contendo estes mesmos plasmídeos. Uma terceira injeção é praticada simultaneamente do outro lado do pescoço. Esta terceira injeção compreende 1 ml de uma solução contém  $5.10^6$  células infectadas por baculovírus recombinantes e 1 ml de adjuvante AIF SEPPIC.

Lote A (F1) (Lote de controlo):

- primeira injeção

Plasmídeo pcADN3ORF1-, plasmídeo pcADN3ORF2- e plasmídeo GMCSF+.

- segunda e terceira injeções (simultâneas)

Plasmídeo pcADN3ORF1-, plasmídeo pcADN3ORF2- e

plasmídeo GMCSF+; Células transformadas por baculovírus não contendo inserção de ácido nucleico que codifica para uma proteína de circovírus MAP;

Adjuvante AIF SEPPIC.

Lote B (F2) (lote controlo):

- primeira injeção

Plasmídeo pcADN3ORF1-, plasmídeo pcADN3ORF2- e plasmídeo GMCSF+ GMCSF+.

- segunda e terceira injeções (simultâneas)

Plasmídeo pcADN3ORF1-, plasmídeo pcADN3ORF2- e plasmídeo GMCSF+; Células transformadas por baculovírus não contendo inserção de ácido nucleico que codifica para uma proteína de circovírus MAP; Adjuvante AIF SEPPIC.

Lote C (F3):

- primeira injeção

Plasmídeo pcADN3ORF1+, plasmídeo pcADN3ORF2+ e plasmídeo GMCSF+;

- segunda e terceira injeções (simultâneas)

Plasmídeo pcADN3ORF1+, plasmídeo pcADN3ORF2+ e plasmídeo GMCSF+;

Células transformadas por baculovírus recombinantes BAC ORF1+ e BAC ORF2+ capazes de expressar respetivamente a proteína Rep de sequência SEQ ID N° 14 e a proteína de sequência SEQ ID N° 15 do circovírus MAP de TIPO B.

Lote D (F4) (lote controlo): nenhuma injeção.

Os lotes de leitões B, C e D são infetados (testados) com a idade de 6 semanas enquanto o lote A não é testado.

3) Monitorização dos lotes

- contagem tosse-espirros: 15 minutos/lote/dia;

- consistências das matérias fecais: todos os dias;

- registos habituais: amostragem de sangue semanal, pesagens;

- pesagens da alimentação recusada: 3 vezes por semana;

- cálculo do ganho médio diário de peso (gmq);

Os ganhos médios diários foram calculados para cada um dos lotes ao longo de um período de 28 dias após o teste (veja-se a figura 10), um cálculo intermediário do gmq foi igualmente efetuado para cada um dos lotes no primeiro e no segundo período de 14 dias. Os resultados obtidos são aqui apresentados de seguida no quadro 6.

Quadro 6: Ganhos médios diários

|         | F1    | F2    | F3    | F4    |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| d1-d14  | 411 g | 450 g | 511 g | 461 g |
| d14-d28 | 623 g | 362 g | 601 g | 443 g |
| d0-d28  | 554 g | 406 g | 556 g | 452 g |

- Medição da hipertermia

A medição de hipertermia, superior a 41 °C (veja-se a figura 11) e superior a 40,2 °C, foi efetuada para cada um dos lotes ao longo de um período total de 28 dias após o teste. Os resultados obtidos, correspondentes à razão expressa em percentagem entre o número de amostragens térmicas superiores a 41 °C (ou superiores a 40,2 °C) e entre o número total de amostragens térmicas efectuadas no conjunto dos porcos por cada período de uma semana, são aqui apresentados de seguida nos quadros 7 e 8, respetivamente para as medições de hipertermia superior a 41 °C e superior a 40,2 °C.

Quadro 7: Hipertermias > 41°C

|    | F1   | F2  | F3 | F4  |
|----|------|-----|----|-----|
| S1 | 4,1  | 0,  | 0, | 0,  |
| S2 | 10,7 | 16, | 0, | 8,9 |
| S2 | 4,7  | 27, | 0, | 45, |
| S4 | 0,   | 0,  | 0, | 7,5 |

Quadro 8: Hipertermias &gt; 40,2 °C

|    | F1   | F2    | F3   | F4   |
|----|------|-------|------|------|
| S1 | 29,1 | 10,41 | 29,1 | 20,8 |
| S2 | 28,5 | 39,2  | 10,7 | 37,5 |
| S2 | 14,3 | 68,7  | 25,0 | 81,2 |
| S4 | 3,3  | 17,5  | 20,0 | 55   |

#### 4) Conclusão

Os registos efetuados mostram claramente que os animais que receberam as três injeções de uma composição vacinal compreendendo fragmentos de ácido nucleico de circovírus MAP segundo a invenção e/ou capazes de expressar proteínas recombinantes de circovírus MAP, em particular do tipo B, não apresentaram hipertermia (veja-se a figura 10). Estes animais não conheceram entre outros uma diminuição no seu crescimento, sendo os gmq comparáveis àqueles dos animais controlo não infectados (veja-se a figura 9). Não apresentaram qualquer sinal clínico particular.

Estes resultados evidenciam a proteção eficaz dos leitões contra a infeção por um circovírus MAP da invenção, agente primário responsável pela MAP ou DFL, conferida por uma composição de vacina preparada a partir do fragmento de ácido nucleico da sequência nucleica de circovírus MAP segundo a invenção, em particular do tipo B, e/ou a partir de proteínas recombinantes codificadas por estes fragmentos de ácidos nucleicos.

Estes resultados mostram em particular que as proteínas codificadas pelas ORF1 e ORF2 de circovírus MAP segundo a invenção são proteínas imunogénicas que induzem uma resposta protetora eficaz para a prevenção da infeção por um circovírus MAP.

EXEMPLO 6: Diagnóstico serológico de circovírus MAP por imunodosagem utilizando proteínas recombinantes ou péptidos de síntese de circovírus MAP

A- Diagnóstico serológico por proteínas recombinantes



A identificação e a sequenciação de circovírus porcino MAP permitem produzir, por técnicas de recombinação genética bem conhecidas pelo perito na técnica, proteínas recombinantes de circovírus MAP.

Através destas técnicas, foram expressas proteínas recombinantes codificadas em particular pela ORF'2 do circovírus MAP, tipo B, por células de inseto Sf9 transformadas e depois isoladas.

Estas proteínas recombinantes codificadas pela ORF'2 são extraídas, após cultura das células sf9 transformadas, por lise celular térmica graças a 3 ciclos de congelação/descongelação -70 °C/+37 °C. Foram igualmente lisadas células Sf9 sãs ou Sf9 controlo não transformadas.

Estas duas frações antigénicas provenientes de células Sf9 controlo não transformadas e de células Sf9 que expressam a ORF'2 são precipitadas a 4 °C por uma solução a 60% mais ou menos 5% de sulfato de amónio saturado. Uma dosagem de proteínas totais é realizada com auxílio do kit Biorad. 500 ng de proteínas Sf9 controlo e de proteínas Sf9 que expressam a ORF'2 semi-purificadas, em solução num tampão bicarbonato 0,05 M pH 9,6 são adsorvidas passivamente no fundo de 3 poços diferentes de uma microplaca Nunc Maxisorp por incubação uma noite a + 4 °C.

A reatividade de soros de porcos em relação a cada uma destas frações antigénicas é avaliada através de uma reação ELISA indireta cujo protocolo experimental é detalhado abaixo:

- Etapa de saturação: 200 µl/cúpula de PBS1X/Leite semidesnatado 3%, incubação 1 h 30 a 37 °C.
- Lavagem: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 3 lavagens rápidas.
- Etapa de incubação dos soros: 100 µl/cúpula de soro diluído a 1/100 em PBS1X/Leite semidesnatado, 1%/Tween 20: 0,05%, incubação 1 h a 37 °C.
- Lavagem: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 2

lavagens rápidas seguidas de 2 lavagens de 5 min.

- Etapa de incubação do conjugado: 50 µl/cúpula de conjugado coelho anti-porco diluído a 1/1000 em PBS1X/Leite semidesnatado, 1%/Tween 20: 0,05%, incubação 1 h a 37 °C.
- Lavagem: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 2 lavagens rápidas seguidas de 2 lavagens de 5 min.
- Etapa de revelação: 100 µl/cúpula de substrato OPD/Tampão Citrato/H2O2, incubação 15 min a 37 °C.
- Paragem da Reação: 50 µl/cúpula H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.
- Leitura no espectrofotómetro a 490 nm.

#### Resultados

Os resultados obtidos são apresentados aqui abaixo no quadro 9.

Quadro 9:

| Antigénios                        | Reatividade do soro de porco não inoculado com circovírus | Reatividade do soro de porco inoculado com o circovírus |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Sf9 de controlo purificada        | 0,076                                                     | 0,088                                                   |
| Sf9 que expressa ORF'2 purificada | 0,071                                                     | 1,035                                                   |

Os resultados são expressos em densidade ótica medida com um espectrofotómetro a 490 nm aquando da análise por ELISA da reatividade dos soros de porco inoculado ou não pelo circovírus MAP de tipo B segundo o protocolo indicado abaixo.

#### B - Diagnóstico Serológico por Péptido de Síntese

A cartografia epitópica das proteínas codificadas por exemplo pelas sequências ORF1 e ORF2 dos dois tipos de circovírus MAP (tipos A e B) permitiu entre outros identificar os epítomos circovirais imunogénicos nas proteínas codificadas pelas sequências nucleicas ORF'1 e

ORF'2 assim como os epítomos específicos da proteína codificada pela sequência nucleica ORF'2 do circovírus MAP tipo B. Quatro epítomos específicos do circovírus MAP tipo B e um epítomo comum aos dois tipos de circovírus MAP situados nas proteínas codificada pela sequência nucleica ORF'2 foram sintetizados sob a forma de péptido. Os péptidos equivalentes no circovírus de tipo A foram igualmente sintetizados. Todos estes péptidos foram avaliados como antigénios de diagnóstico no quadro da realização de um teste serológico.

#### Resultados

Os resultados obtidos representam-se no quadro 10 seguinte.

por seqüências nucleicas ORF2 e ORF'2 de circovírus MAP de tipo A e B

| Reatividade do soro de porcos infectados por circovírus B |         |                  |          |          |          |                |
|-----------------------------------------------------------|---------|------------------|----------|----------|----------|----------------|
| Tipo de                                                   | EOBS    | Conven           | Conven   | Especif  |          |                |
| Peptido circovírus                                        | Posição | Sequência AA     | D0/D54   | 1        | 2        | epitópica      |
| MAP                                                       |         |                  |          | D0/D42   | D0/D42   |                |
| 121                                                       | 71-85   | VDMMRENIDFLPPG   | +/-, +++ | +/-, +++ | - , +++  | Circovírus B   |
| 177                                                       | 70-84   | MVNEIRENIGQLPP   | +/-, +   | +/-, +/- | +/-, -   |                |
| 132                                                       | 115-129 | QGDRCVGSsavILDD  | +/-, +/- | ++ , ++  | +/-, +   | Circovírus B   |
| 188                                                       | 114-127 | TSNQRCVGSIVIL    | +/-, -   | - , +/-  | +/-, +/- |                |
| 133                                                       | 119-134 | GVGSsavILDDNVETK | - , ++   | ++ , +++ | +/-, ++  |                |
| 189                                                       | 118-132 | RGVGSIVILDDNMFV  | +/-, -   | - , +/-  | +/-, +/- |                |
| 146                                                       | 171-185 | FTIDYFQPNKRQQL   | - , +/-  | - ++     | - , ++   | Circovírus A e |
| 202                                                       | 170-184 | DQTIDWFQPNKRQ    | +++      | +/-, ++  | + , ++   | B              |
|                                                           |         |                  | +++      |          |          |                |
| 152                                                       | 195-209 | VDHVGIGTAFENSY   | - , ++   | +++; ++  | +/-, +   | Circovírus B   |
| 208                                                       | 194-208 | NVEHTGLGALQNMAT  | - , -    | - , -    | - , -    |                |

**EXEMPLO 7:** Caracterização dos epítomos específicos do circovírus MAP do tipo B

São escolhidas para este estudo as proteínas codificadas pela ORF2 dos circovírus porcinos do tipo A e B. Para cada uma das ORF2 (tipos A e B), foram sintetizados 56 péptidos de 15 aminoácidos que se sobrepõem a cada 4 aminoácidos, recobrando deste modo a totalidade da proteína (veja-se o quadro 11 abaixo).

**Quadro 11:** Sequência de aminoácidos dos 56 péptidos de 15 aminoácidos sintetizados a partir da sequência nucleica ORF'2 (tipo B) e ORF2 (tipo A) de circovírus MAP com o respectivo número de "spot" correspondente (veja-se a figura 12)

| <b>ORF'2 tipo B</b> |                  | <b>ORF2 tipo A</b> |                  |
|---------------------|------------------|--------------------|------------------|
| <i>Spot n°</i>      | Sequência        | <i>Spot n°</i>     | Sequência        |
| 104                 | MTYPRRRYRRRRHRP  | 160                | MTWPRRRYRRRRTRP  |
| 105                 | RRRYRRRRHRPRSHL  | 161                | RRRYRRRRTRPRSHL  |
| 106                 | RRRRHRPRSHLGQIL  | 162                | RRRRTRPRSHLGNIL  |
| 107                 | HRPRSHLGQILRRRP  | 163                | TRPRSHLGNILRRRP  |
| 108                 | SHLGQILRRRPWL VH | 164                | SHLGNILRRRPYL VH |
| 109                 | QILRRRPWL VHPRHR | 165                | NILRRRPYL VHPAFR |
| 110                 | RRPWL VHPRHRYRWR | 166                | RRPYL VHPAFRNRYR |
| 111                 | LVHPRHRYRWRRKNG  | 167                | LVHPAFRNRYRWRRK  |
| 112                 | RHRYRWRRKNGIFNT  | 168                | AFRNRYRWRRK TGIF |
| 113                 | RWRRKNGIFNTRL SR | 169                | RYRWRRK TGIFNSRL |
| 114                 | KNGIFNTRL SRTFGY | 170                | RRK TGIFNSRLSREF |
| 115                 | FNTRL SRTFGYTVKR | 171                | GIFNSRLSREFVLT I |
| 116                 | LSRTFGYTVKR TTVR | 172                | SRLSREFVLT IRGGH |
| 117                 | FGYTVKR TTVRTPSW | 173                | REFVLT IRGGHSQPS |
| 118                 | VKR TTVRTPSWAVDM | 174                | LTIRGGHSQPSWNVN  |
| 119                 | TVRTPSWAVDMMRFN  | 175                | GGHSQPSWNVNELRF  |
| 120                 | PSWAVDMMRFNINDF  | 176                | QPSWNVNELRFNIGQ  |
| 121                 | VDMMRFNINDFLPPG  | 177                | NVNELRFNIGQFLPP  |
| 122                 | RFNINDFLPPGGGSN  | 178                | LRFNIGQFLPPSGGT  |
| 123                 | NDFLPPGGGSNPRSV  | 179                | IGQFLPPSGGTNPLP  |

| ORF'2 tipo B |                  | ORF2 tipo A |                 |
|--------------|------------------|-------------|-----------------|
| Spot n°      | Sequência        | Spot n°     | Sequência       |
| 124          | PPGGGSNPRSVPFEEY | 180         | LPPSGGTNPLPLPFQ |
| 125          | GSNPRSVPFEEYRIR  | 181         | GGTNPLPLPFQYYRI |
| 126          | RSVPFEEYRIRKVKV  | 182         | PLPLPFQYYRIRKAK |
| 127          | FEYYRIRKVKVEFWP  | 183         | PFQYYRIRKAKYEFY |
| 128          | RIRKVKVEFWPCSPI  | 184         | YRIRKAKYEFYPRDP |
| 129          | VKVEFWPCSPITQGD  | 185         | KAKYEFYPRDPITSN |
| 130          | FWPCSPITQGDRGVG  | 186         | EFYPRDPITSNQRGV |
| 131          | SPITQGDRGVGSSAV  | 187         | RDITSNQRGVGSTV  |
| 132          | QGDRGVGSSAVILDD  | 188         | TSNQRGVGSTVVILD |
| 133          | GVGSSAVILDDNFVT  | 189         | RGVGSTVVILDANFV |
| 134          | SAVILDDNFVTKATA  | 190         | STVVILDANFVTPST |
| 135          | LDDNFVTKATALTYD  | 191         | ILDANFVTPSTNLAY |
| 136          | FVTKATALTYDPYVN  | 192         | NFVTPSTNLAYDPYI |
| 137          | ATALTYDPYVNYSSR  | 193         | PSTNLAYDPYINYSS |
| 138          | TYDPYVNYSSRHTIT  | 194         | LAYDPYINYSSRHTI |
| 139          | YVNYSSRHTITQPFS  | 195         | PYINYSSRHTIRQPF |
| 140          | SSRHTITQPFSYHSR  | 196         | YSSRHTIRQPFYHS  |
| 141          | TITQPFSYHSRYFTP  | 197         | HTIRQPFYHSRYFT  |
| 142          | PFSYHSRYFTPKPVL  | 198         | QPFYHSRYFTPKPE  |
| 143          | HSRYFTPKPVLDFTI  | 199         | YHSRYFTPKPELDQT |
| 144          | FTPFPVLDFTIDYFQ  | 200         | YFTPPELDQTIDWF  |
| 145          | PVLDFTIDYFQPNNK  | 201         | KPELDQTIDWFQPNN |
| 146          | FTIDYFQPNNKRNQL  | 202         | DQTIDWFQPNNKRNQ |
| 147          | YFQPNNKRNQLWLR   | 203         | DWFQPNNKRNQLWLH |
| 148          | NNKRNQLWLRQLTAG  | 204         | PNNKRNQLWLHLNTH |
| 149          | NQLWLRQLTAGNVDH  | 205         | RNQLWLHLNTHTNVE |
| 150          | LRLQTAGNVDHVGLG  | 206         | WLHLNTHTNVEHTGL |
| 151          | TAGNVDHVGLGTAFE  | 207         | NTHTNVEHTGLGYAL |
| 152          | VDHVGLGTAFENSIY  | 208         | NVEHTGLGYALQNAT |
| 153          | GLGTAFENSIYDQEY  | 209         | TGLGYALQNATTAQN |
| 154          | AFENSIYDQEYNIRV  | 210         | YALQNATTAQNYVVR |
| 155          | SIYDQEYNIRVTMYV  | 211         | NATTAQNYVVRVTIY |
| 156          | QEYNIRVTMYVQFRE  | 212         | AQNYVVRVTIYVQFR |

| ORF'2 tipo B |                 | ORF2 tipo A |                 |
|--------------|-----------------|-------------|-----------------|
| Spot n°      | Sequência       | Spot n°     | Sequência       |
| 157          | IRVTMYVQFREFNFK | 213         | VVRLTIYVQFREFIL |
| 158          | MYVQFREFNFKDPPL | 214         | TIYVQFREFILKDPL |
| 159          | VQFREFNFKDPPLNP | 215         | YVQFREFILKDPLNE |

Estes péptidos foram sintetizados segundo o método "spot" que consiste numa síntese simultânea de um grande número de péptidos num suporte sólido de celulose, constituindo cada local de síntese de um péptido um "spot" (Synt: em, NIMES). Este método implica uma orientação dos péptidos na placa, sendo estes fixados de modo covalente pela extremidade carboxi-terminal. Um "spot" representa cerca de 50 nmol de péptido.

A referência dos "spots" e das sequências peptídicas correspondentes é dada no quadro 11.

Estas membranas foram utilizadas para testes de imunorreatividade em relação a soro de porcos EOPS infetados ou não experimentalmente pela estirpe circoviral MAP tipo B assim como em relação a soros de porcos infetados, provenientes de criações convencionais (criações convencionais 1 ou 2). Este estudo permitiu evidenciar péptidos imunorreativos específicos do circovírus de tipo B correspondente aos "spots" N° 121, N° 132, N° 133 e N° 152 (respetivamente sequências de aminoácidos SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20). É apresentada uma ilustração na figura 12 onde as membranas são reveladas com um soro de porco infetado, proveniente de uma criação convencional. Foram igualmente evidenciados péptidos imunorreativos não específicos do tipo entre os quais se retém o péptido N° 146 que é fortemente imunogénico.

Uma comparação entre as sequências peptídicas dos circovírus de tipo A e B (figura 13) indica uma divergência compreendida entre 20 e 60% para os péptidos imunorreativos específicos do tipo B, e uma divergência mais fraca (13%)

entre os péptidos não específicos.

#### Referências bibliográficas

- Allan, G. M. et al., 1995, Vet. Microbiol., 44: 49-64.
- Barany, F., 1911, PNAS. USA, 88: 189-193.
- Boulton, L.H. et al., 1997, J. Gen. Virol., 78 (Pt 6), 1265-1270.
- Buckholz, R.G., 1993, Yeast systems for the expression of heterologous gene products. Curr. Op. Biotechnology 4: 538-542.
- Burg, J.L. et al., 1996, Mol. and Cell. Probes, 10: 257-271.
- Chu, B.C.F. et al., 1986, NAR, 14: 5591-5603.
- Chu, P.W.G. et al., 1993, Virus Research, 27: 161-171.
- Clark, E.G., 1997, American Association of Swine Practitioners, 499-501.
- Daft, B. et al., 1996, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 32.
- Derse, D. et al., 1995, J. Virol., 69(3): 1907-1912.
- Duck, P. et al., 1990, Biotechniques, 9: 142-147.
- Dulac, G.C. et al., 1989, Can. J. Vet. Res., 53: 431-433.
- Edwards, C.P., and Aruffo, A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4: 558-563.
- Edwards, S. et al., 1994, Vet. Rec., 134: 680-681.
- Erlich, H.A., 1989, In PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press.
- Felgner, et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 7413.
- Fontes, E.P.B. et al., 1994, J. Biol. Chem., Vol. 269, N° 11: 8459-8465.
- Fraley et al., 1980, J. Biol. Chem., 255: 1043 1.
- Guateli, J.C. et al., 1990, PNAS. USA, 87: 1874-1878.
- Hackland, A.F. et al., 1994, Arch. Virol., 139: 1-22.
- Hanson, S.F. et al., 1995, Virology, 211: 1-9.
- Harding, J.C., 1997, American Association of Swine



Practitioners, 503.

Harding, R.M. et al., 1993, *Journal of General Virology*, 74: 323-328.

Harding, J.C. et Clark, E.G., 1997, *Swine Health and Production*, Vol. 5, N° 5 201-203.

Heyraud-Nitschke, F. et al., 1995, *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, N° 6.

Homer, G.W., 1991, *Surveillance* 18(5): 23.

Houbenweyl, 1974, in *Meuthode der Organischen Chemie*, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.

Huygen, K. et al., 1996, *Nature Medicine*, 2(8): 893-898.

Innis, M.A. et al., 1990, in *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press.

Kaneda, et al., 1989, *Science*, 243: 375.

Kievitis, T. et al., 1991, *J. Virol. Methods*, 35: 273-286.

Kohler, G. et al., 1975, *Nature*, 256(5517): 495-497.

Kwoh, D.Y. et al., 1989, *PNAS. USA*, 86: 1173-1177.

Ladany, S. et al., 1989, *J. Clin. Microbiol.* 27: 2778-2783.

Lazarowitz, S. G. et al., 1989, *The EMBO Journal*, Vol. 8 N° 4: 1023-1032.

Luckow, V.A., 1993, *Baculovirus systems for the expression of human gene products*. *Curr. Op. Biotechnology* 4:564-572.

Mankertz, A. et al., 1997, *J. Virol.*, 71: 2562-2566.

Matthews, J.A. et al., 1988, *Anal. Biochem.*, 169: 1-25.

McNeilly, F. et al., 1996, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 49: 295-306.

Meehan, B.M. et al., 1997, *J. Gen. Virol.*, 78: 221-227.

Merrifield, R.D., 1966, *J. Am. Chem. Soc.*, 88(21): 5051-5052.

Midoux, 1993, *Nucleic Acids Research*, 21: 871-878.

Miele, E.A. et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 171: 281-295.

Murphy, F.A. et al., 1995, *Sixth Report of the*

- International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien New York.
- Nayar, G.P. et al., 1997, Can. Vet. J. 38(6): 385-386.
- Olins, P.O., and Lee, S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4 520-525.
- Pagano et al., 1967, J. Virol., 1: 891.
- Rolfs, A. et al., 1991, In PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease. Berlin:Springer-Verlag.
- Sambrook, J. et al., 1989, In Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Pescador, R., 1988, J. Clin. Microbiol., 26(10): 1934-1938.
- Segev D., 1992, in «Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules». Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York: 197-205.
- Shiver, J.W., 1995, in Vaccines 1995, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E., pp.95-98, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Tascon, R.E et al., 1996, Nature Medicine, 2(8): 888-892.
- Tischer, I. et al., 1982, Nature, 295: 64-66.
- Tischer, I. et al., 1986, Arch. Virol., 91: 271-276.
- Tischer, I. et al., 1988, Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 270: 280-287.
- Tischer, I. et al., 1995, Arch. Virol., 140: 737-743.
- Urdea, M.S., 1988, Nucleic Acids Research, 11: 4937-4957.
- Walker, G.T. et al., 1992, NAR 20: 1691-1696.
- Walker, G.T. et al., 1992, PNAS. USA, 89: 392-396.
- White, B.A. et al., 1997, Methods in Molecular Biology, 67, Humana Press, Towota.
- Zhao, T.M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93(13): 6653-6658.

## LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> WYETH LLC

<120> SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADO À DOENÇA DO  
EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (MAP)

<130> D17221

<140> EP 08154913.1

<141> 04-12-1998

<150> FR 97 15396

<151> 05-12-1997

<150> PCT/FR98/02634

<151> 04-12-1998

<150> EP 98958957.7

<151> 04-12-1998

<160> 20

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1759

<212> ADN

<213> Circovírus MAP tipo A

<220>

<223> Cadeia de polaridade + (5'-3')

<400> 1

```

accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcgctca gtgaaaatgc caagcaagaa 60
aagcggcccg caaccccata agaggtgggt gttcaccctt aataatcctt ccgaggagga 120
gaaaaacaaa atacgggagc ttccaatctc cctttttgat tattttgttt gtggcgagga 180
aggtttgtaa gagggtagaa ctccctcacct ccaggggttt gcgaattttg ctaagaagca 240
gacttttaac aaggtgaagt ggtattttgg tgcccgtgc caccgcgaga aagcgaaagg 300
aaccgaccag cagaataaag aatactgcag taaagaaggc cacatactta tcgagtgtgg 360
agctccgcgg aaccagggga agcgcagcga cctgtctact gctgtgagta cccttttgga 420
gacggggtct ttggtgactg tagccgagca gtttcctgta acgtatgtga gaaatttccg 480
cgggctggct gaacttttga aagtgagcgg gaagatgcag aagcgtgatt ggaagacagc 540
tgtacacgtc atagtgggcc cgcccgggtt tggaagagc cagtgggccc gtaattttgc 600
tgagcctagg gacacctact ggaagcctag tagaaataag tgggtgggat gatatactgg 660
agaagaagtt gttgttttgg atgattttta tggctgggta ccttgggatg atctactgag 720
actgtgtgac cggtatccat tgactgtaga gactaaaggg ggtactgttc cttttttggc 780
ccgcagtatt ttgattacca gcaatcaggc cccccaggaa tggctactct caactgctgt 840
cccagctgta gaagctctct atcggaggat tactactttg caattttgga agactgctgt 900
agaacaatcc acggagggtac ccgaaggccg atttgaagca gtggaccac cctgtgccct 960
tttcccatat aaaataaatt actgagtctt tttgtttatc acatcgtaat ggtttttatt 1020
tttattcatt tagaggggtct ttcaggataa attctctgaa ttgtacataa atagtcaacc 1080
ttaccacata attttgggct gtggttgcac tttggagcgc atagcccagg cctgtgtgct 1140
cgacattggg gtgggtattt aaatggagcc acagctggtt tcttttatta tttggctgga 1200
accaatcaat tgtttggtct agctctgggt tgggggtgaa gtacctggag tggtaggtaa 1260
agggtgcct tatggtgtgg cgggaggagt agttaatata ggggtcatag gccaaagtgg 1320
tgaggggggt tacaaagttg gcatccaaga taacaacagt ggaccaaca cctctttgat 1380
tagaggtgat ggggtctctg gggtaaaatt catatttagc ctttctaata cggtagtatt 1440
ggaaaggtag gggtaggggg ttggtgccgc ctgagggggg gaggaactgg ccgatgttga 1500
atctcagctc gttaacattc caagatggct gcgagtgtcc tcctcttatg gtgagtacaa 1560

attctctaga aaggcgggaa ttgaagatac ccgtctttcg gcgccatctg taacggtttc 1620
tgaaggcggg gtgtacaaaa tatggtcttc tccggaggat gtttccaaga tggctgcggg 1680
ggcgggtccg tcttctgcgg taacgcctcc ttggccacgt catcctataa aagtgaagaa 1740
agtgcgctgc ttagtagtatt
1759

```

<210> 2

<211> 1759

<212> ADN

<213> Circovírus MAP tipo A

<220>

<223> Cadeia de polaridade - (5'-3')

<400> 2

```

aatactacag cagcgcactt ctttcacttt tataggatga cgtggccaag gaggcgttac 60
cgcagaagac ggacccgccc ccgcagccat cttggaaacg tcctccggag aagaccatat 120
ttggtacacc ccgccttcag aaaccgttac agatggcgcc gaaagacggg tatcttcaat 180
tcccgccttt ctagagaatt tgtactcacc ataagaggag gacactcgca gccatcttgg 240
aatgttaacg agctgagatt caacatcggc cagttcctcc cccctcagg cggcaccaac 300
cccctacccc tacctttcca atactaccgt attagaaagg ctaaatatga attttacccc 360
agagacccca tcacctctaa tcaaagaggt gttgggtcca ctgttggtat cttggatgcc 420
aactttgtaa cccctccac caacttggcc tatgacct atattaacta ctctcccg 480
cacaccataa ggcagccctt tacctaccac tccaggtagt tcaccccca accagagcta 540
gaccaaacia ttgattggtt ccagccaaat aataaaagaa accagctgtg gctccattta 600
aatacccaca ccaatgtcga gcacacaggc ctgggctatg cgctccaaa tgcaaccaca 660
gccccaaatt atgtggttaag gttgactatt tatgtacaat tcagagaatt tatctgaaa 720
gacctcttaa atgaataaaa ataaaaacca ttacgatgtg ataacaaaa agactcagta 780
atztatttta tatgggaaaa gggcacaggg tgggtccact gcttcaaac ggcttcggg 840
tacctccgtg gattgttctc cagcagtctt ccaaaattgc aaagtagtaa tcctccgata 900
gagagcttct acagctggga cagcagttga ggagtaccat tcctgggggg cctgattgct 960
ggtaatacaa atactgcgg ccaaaaaagg aacagtacc ctttagtct ctacagtcaa 1020
tggatacccg tcacacagtc tcagtagatc atcccaagg aaccagccat aaaaatcatc 1080
caaaacaaca acttcttctc catgatatcc atcccaccac ttatttctac taggcttcca 1140
gtagggtgtc ctaggctcag caaaattacg ggccactgg ctctccacc aaccgggagg 1200
gcccactatg acgtgtacag ctgtcttcca atcacgtgc tgcattctcc cgctcacttt 1260
caaaagttca gccagccgc ggaaatttct cacatacgtt acaggaaact gctcggctac 1320
agtcacaaa gacccgtct ccaaaagggt actcacagca gtagacaggt cgctcgctt 1380
cccctgggtc cgcgagctc cacactcgat aagtatgtgg cttctttac tgcagtattc 1440
tttattctgc tggtcggtt ctttcgctt ctcgatgtgg cagcgggcac caaaatacca 1500
cttcaccttg ttaaaagtct gttcttagc aaaattcgca aaccctgga ggtgaggagt 1560
tctacctct tccaaacctt cctcgccaca acaaaaataa tcaaaaagg agattggaag 1620
ctcccgatt ttgttttct cctcctcgga aggattatta agggatgaaca cccacctctt 1680
atggggttgc gggcgctt tcttgcttg cattttcact gacgctgcc aggtgctgcc 1740
gctgccgaag tgcgctggt 1759

```

<210> 3

<211> 939

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<220>

<223> ORF1

<400> 3

```

atgccaaagca agaaaagcgg cccgcaaccc cataagaggt ggggtgttcac ccttaataat 60
ccttccgagg aggagaaaaa caaaatacgg gagcttccaa tctccctttt tgattatttt 120
gtttgtggcg aggaaggttt ggaagagggt agaactcctc acctccaggg gtttgcaat 180
tttgctaaga agcagacttt taacaagggt aagtgggtatt ttggtgccc ctgccacatc 240
gagaaagcga aaggaaccga ccagcagaat aaagaatact gcagtaaaga aggccacata 300
cttatcgagt gtggagctcc gcggaaccag gggaagcgca gcgacctgtc tactgctgtg 360
agtacccttt tggagacggg gtctttggtg actgtagccg agcagtttcc tgtaacgtat 420

```

```

gtgagaaatt tccgcgggct ggctgaactt ttgaaagtga gcggaagat gcagcagcgt 480
gattggaaga cagctgtaca cgtcatagtg ggcccgcccg gttgtgggaa gagccagtgg 540
gcccgtaat ttgctgagcc tagggacacc tactggaagc ctagtagaaa taagtgggtgg 600
gatggatata atggagaaga agttgttgtt ttggatgatt tttatggctg gttaccttgg 660
gatgatctac tgagactgtg tgaccgggat ccattgactg tagagactaa aggggggtact 720
gttccttttt tggcccgag tattttgatt accagcaatc agggcccccga ggaatgggtac 780
tcctcaactg ctgtcccagc tgtagaagct ctctatcgga ggattactac tttgcaattt 840
tggaagactg ctggagaaca atccacggag gtacccgaag gccgatttga agcagtggac 900
ccaccctgtg cccttttccc atataaaata aattactga 939

```

<210> 4

<211> 702

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<220>

<223> ORF2

<400> 4

```

atgacgtggc caaggaggcg ttaccgcaga agacggaccc gccccgcag ccatcttggg 60
aacatcctcc ggagaagacc atatttggtg caccgcgct tcagaaaccg ttacagatgg 120
cgccgaaaga cgggtatctt caattcccgc ctttctagag aatttgtact caccataaga 180
ggaggacact cgcagccatc ttggaatggt aacgagctga gattcaacat cggccagttc 240
ctccccccct caggcggcac caaccacctt cccctacctt tccaatacta ccgtattaga 300
aaggctaaat atgaatttta ccccagagac cccatcacct ctaatcaaag aggtgttggg 360
tccactgttg ttatcttggg tgccaacttt gtaacccct ccaccaactt ggcctatgac 420
ccctatatta actactctc ccgccacacc ataaggcagc cctttacctt ccactccagg 480
tacttcaccc ccaaaccaga gctagaccaa acaattgatt ggttcagcc aaataataaa 540
agaaaccagc tgtgggtcca tttaaatacc cacaccaatg tcgagcacac aggcctgggc 600
tatgcgctcc aaaatgcaac cacagcccaa aattatgtgg taaggttgac tatttatgta 660
caattcagag aatttatcct gaaagaccct ctaaatgaat aa 702

```

<210> 5

<211> 621

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<220>

<223> ORF3

<400> 5

```

atgatatcca tcccaccact tatttctact aggcttccag taggtgtccc taggctcagc 60
aaaattacgg gccactggc tcttcccaca accgggcggg cccactatga cgtgtacagc 120
tgtcttccaa tcacgctgct gcatcttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaatttctc acatacgtta caggaaaactg ctgggtaca gtcaccaaag acccgtctc 240
caaaagggtg ctcacagcag tagacaggtc gctgcgcttc ccctggttcc gcggagctcc 300
aactcgata agtatgtggc cttctttact gcagtattct ttattctgct ggtcggttcc 360
tttcgctttc tcgatgtggc agcgggcacc aaaataccac ttcaccttgt taaaagtctg 420
cttcttagca aaattcgcaa acccctggag gtgaggagtt ctaccctctt ccaaaccctc 480
ctcgccacaa acaaaaataat caaaaaggga gattggaagc tcccgtattt tgtttttctc 540
ctcctcgga ggattattaa ggggtgaacac ccacctctta tgggggttgcg ggccgctttt 600
cttgcttggc attttcaactg a 621

```

<210> 6

<211> 312

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<400> 6

```

Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe
  1                      5                      10          15

```

```

Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu
      20                      25                      30

Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu
      35                      40                      45

Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Glu Gly Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys
      50                      55                      60

Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg Cys His Ile
      65                      70                      75                      80

Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys
      85                      90                      95

Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly Lys
      100                     105                     110

Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Gln Thr Gly Ser
      115                     120                     125

Leu Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe
      130                     135                     140

Arg Gly Leu Ala Gln Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg
      145                     150                     155                     160

Asp Trp Lys Thr Ala Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly
      165                     170                     175

Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp
      180                     185                     190

Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val
      195                     200                     205

Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu
      210                     215                     220

Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr
      225                     230                     235                     240

Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala Pro
      245                     250                     255

Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr
      260                     265                     270

Arg Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Gln Gln Ser
      275                     280                     285

Thr Glu Val Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala
      290                     295                     300

Leu Phe Pro Tyr Lys Ile Asn Tyr
      305                     310

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 233



&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo A

&lt;400&gt; 7

```

Met Thr Trp Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Thr Arg Pro Arg
 1               5              10              15

Ser His Leu Gly Asn Ile Leu Arg Arg Arg Pro Tyr Leu Val His Pro
      20              25              30

Ala Phe Arg Asn Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Thr Gly Ile Phe Asn
      35              40              45

Ser Arg Leu Ser Arg Glu Phe Val Leu Thr Ile Arg Gly Gly His Ser
      50              55              60

Gln Pro Ser Trp Asn Val Asn Glu Leu Arg Phe Asn Ile Gly Gln Phe
      65              70              75              80

Leu Pro Pro Ser Gly Gly Thr Asn Pro Leu Pro Leu Pro Phe Gln Tyr
      85              90              95

Tyr Arg Ile Arg Lys Ala Lys Tyr Glu Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ile
      100             105             110

Thr Ser Asn Gln Arg Gly Val Gly Ser Thr Val Val Ile Leu Asp Ala
      115             120             125

Asn Phe Val Thr Pro Ser Thr Asn Leu Ala Tyr Asp Pro Tyr Ile Asn
      130             135             140

Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Arg Gln Pro Phe Thr Tyr His Ser Arg
      145             150             155             160

Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Glu Leu Asp Gln Thr Ile Asp Trp Phe Gln
      165             170             175

Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu His Leu Asn Thr His Thr
      180             185             190

Asn Val Glu His Thr Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Gln Asn Ala Thr Thr
      195             200             205

Ala Gln Asn Tyr Val Val Arg Leu Thr Ile Tyr Val Gln Phe Arg Glu
      210             215             220

Phe Ile Leu Lys Asp Pro Leu Asn Glu
      225             230

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo A

&lt;400&gt; 8

```

Met Ile Ser Ile Pro Pro Leu Ile Ser Thr Arg Leu Pro Val Gly Val
 1             5             10             15

Pro Arg Leu Ser Lys Ile Thr Gly Pro Leu Ala Leu Pro Thr Thr Gly
          20             25             30
Arg Ala His Tyr Asp Val Tyr Ser Cys Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
          35             40             45

Leu Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser His
 50             55             60

Ile Arg Tyr Arg Lys Leu Leu Gly Tyr Ser His Gln Arg Pro Arg Leu
 65             70             75             80

Gln Lys Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Ala Ala Leu Pro Leu Val
          85             90             95

Pro Arg Ser Ser Thr Leu Asp Lys Tyr Val Ala Phe Phe Thr Ala Val
          100             105             110

Phe Phe Ile Leu Leu Val Gly Ser Phe Arg Phe Leu Asp Val Ala Ala
          115             120             125

Gly Thr Lys Ile Pro Leu His Leu Val Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys
          130             135             140

Ile Arg Lys Pro Leu Glu Val Arg Ser Ser Thr Leu Phe Gln Thr Phe
          145             150             155             160

Leu Ala Thr Asn Lys Ile Ile Lys Lys Gly Asp Trp Lys Leu Pro Tyr
          165             170             175

Phe Val Phe Leu Leu Leu Gly Arg Ile Ile Lys Gly Glu His Pro Pro
          180             185             190

Leu Met Gly Leu Arg Ala Ala Phe Leu Ala Trp His Phe His
          195             200             205

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1767

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadeia de polaridade + (5'-3')

&lt;400&gt; 9

```

accagcgcac  ttccggcagcg  gcagcacctc  ggcagcacct  cagcagcaac  atgcccagca  60
agaagaatgg  aagaagcgga  ccccaacccc  ataaaagggtg  ggtgttcact  ctgaataatc  120
cttccgaaga  cgagcgcaag  aaaatacggg  atcttccaat  atccctatct  gattatttta  180
ttgttggcga  ggagggtaat  gaggaaggac  gaacacctca  cctccagggg  ttcgctaatt  240
ttgtgaagaa  gcagactttt  aataaagtga  agtgggtattt  ggggtgccgc  tgccacatcg  300
agaaagcgaa  aggaacagat  cagcagaata  aagaatactg  cagtaaagaa  ggcaacttac  360
tgatggagtg  tggagctcct  agatctcagg  gacaacggag  tgacctgtct  actgctgtga  420
gtaccttggt  ggagagcggg  agtctgggtg  ccgttgcaga  gcagcaccct  gtaacgtttg  480
tcagaaatct  ccgcgggctg  gctgaacttt  tgaaagttag  cgggaaaatg  cagaagcgtg  540
attggaagac  taatgtacac  gtcattgtgg  ggccacctgg  gtgtggtaaa  agcaaagggg  600
ctgctaattt  tgcagacccg  gaaaccacat  actggaaacc  acctagaaac  aagtgggtgg  660
atggttacca  tgggtgaagaa  gtggttggtt  ttgatgactt  ttatggctgg  ctgccctggg  720
atgatctact  gagactgtgt  gatcgatata  cattgactgt  agagactaaa  ggtggaactg  780
tacctttttt  ggcccgcagt  attctgatta  ccagcaatca  gaccccgttg  gaatgggtact  840
cctcaactgc  tgtcccagct  gtagaagctc  tttatcggag  gattacttcc  ttggtatttt  900
ggaagaatgc  tacagaacaa  tccacggagg  aagggggcca  gttcgtcacc  ctttcccccc  960
catgccctga  atttccatat  gaaataaatt  actgagtctt  ttttatcact  tcgtaatggg  1020

```

```

ttttattatt  cattaagggt  taagtggggg  gtcttttaaa  ttaaattctc  tgaattgtac  1080
atacatgggt  acacggatat  tgtattcctg  gtctgtatata  ctgttttcga  acgcagtgcc  1140
gaggcctacg  tgggtctacat  ttccagcagt  ttgtagtctc  agccacagct  ggtttctttt  1200
gttggtttgg  tggaagtaat  caatagttaa  atctaggaca  gggttggggg  taaagtaccg  1260
ggagtggtag  gagaagggct  gggttatggt  atggcgggag  gagtagttta  cataggggtc  1320
ataggtgagg  gctgtggcct  ttgttataaa  gttatcatct  aaaataacag  cactggagcc  1380
cactcccctg  tcaccctggg  tgatcgggga  gcaggggccg  aattcaacct  taacctttct  1440
tattctgtag  tattcaaagg  gcacagagcg  ggggtttgac  cccctcctg  ggggaagaaa  1500
gtcattaata  ttgaatctca  tcatgtccac  cgcccaggag  ggcgttctga  ctgtggttcg  1560
cttgacagta  tatccgaagg  tgcgggagag  gcgggtgttg  aagatgccat  ttttctttct  1620
ccagcggtaa  cgggtggcgg  ggtggacgag  ccaggggcgg  cggcggagga  tctggccaag  1680
atggctgcgg  gggcgggtgc  ttcttcttcg  gtaacgcctc  cttggatacg  tcataatctga  1740
aaacgaaaga  agtgcgctgt  aagtatt  1767

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1767

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadeia de polaridade - (5'-3')

&lt;400&gt; 10

```

aatacttaca ggcgacttct ttcgttttca gatatgacgt atccaaggag gcgttaccga 60
agaagaagac accgcccccg cagccatctt ggccagatcc tccgcgcgccc cccctggctc 120
gtccaccccc gccaccgtta ccgctggaga aggaaaaatg gcatcttcaa cccccgcctc 180
tcccgcacct tcggatatac tgtcaagcga accacagtca gaacgcctc ctgggcggtg 240
gacatgatga gattcaatat taatgacttt ctccccccag gagggggggtc aaacccccgc 300
tctgtgccct ttgaatacta cagaataaga aagggttaagg ttgaattctg gccctgctcc 360
ccgatcacc cagggtgacag gggagtgggc tccagtgtctg ttattttaga tgataacttt 420
gtaacaaagg ccacagccct cacctatgac ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc 480
ataaccagc ccttctccta ccaactcccg tactttaccc ccaaacctgt cctagatttc 540
actattgatt acttccaacc aaacaacaaa agaaaccagc tgtgggtgag actacaaact 600
gctggaaatg tagaccacgt aggcctcggc actgcgttcg aaaacagtat atacgaccag 660
gaatacaata tccgtgtaac catgtatgta caattcagag aatttaattt taaagacccc 720
ccacttaacc cttaatgaat aataaaaacc attacgaagt gataaaaaag actcagtaat 780
ttatttcata tggaaattca gggcatgggg gggaaagggt gacgaactgg ccccttctc 840
ccgtggattg ttctgtagca ttcttccaaa ataccaagga agtaatcctc cgataaagag 900
cttctacagc tgggacagca gttgaggagt accattccaa cgggggtctga ttgctggtaa 960
tcagaatact gcgggccaaa aaaggtacag ttccaccttt agtctctaca gtcaatggat 1020
atcgatcaca cagtctcagt agatcatccc agggcagcca gccataaaag tcatcaataa 1080
caaccacttc ttaccatgg taacctccc accacttggt tctaggtggt ttccagtatg 1140
tggtttccgg gtctgcaaaa ttagcagccc atttgctttt accacaccca ggtggcccca 1200
caatgacgtg tacattagtc ttccaatcac gcttctgcat tttcccgctc actttcaaaa 1260
gttcagccag ccgcggaaa tttctgacaa acgttacagg gtgctgctct gcaacgggtca 1320
ccagactccc gctctccaac aaggtagtca cagcagtaga caggtcactc cgttgtccct 1380
gagatctagg agctccacac tccatcagta agttgccttc tttactgcag tattctttat 1440
tctgctgac tggttcctttc gctttctcga tgtggcagcg ggcacccaaa taccacttca 1500
ctttattaaa agtctgcttc ttcacaaaat tagcgaaccc ctggagggtg ggtgttcgtc 1560
cttcctcatt accctcctcg ccaacaataa aataatcaaa tagggatatt ggaagatccc 1620
gtattttctt gcgctcgtct tcggaaggat tattcagagt gaacaccac cttttatggg 1680
gttgggggtc gcttcttcca ttcttcttgc tgggcatgtt gctgctgagg tgctgccgag 1740
gtgctgccgc tgccgaagtg cgctggt

```

<210> 11

<211> 945

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo B

<220>

<223> ORF1

<400> 11

```

atgcccagca agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact 60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct 120
gattatctta ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg 180
ttcgctaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggatatt gggtgcccgc 240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa 300
ggcaacttac tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct 360
actgctgtga gtacctgtt ggagagcggg agtctggtga ccgttgcaga gcagcaccct 420
gtaacgtttg tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg 480
cagaagcgtg attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctg gtgtggtaaa 540
agcaaatggg ctgctaattt tgacagcccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac 600
aagtgggtgg atggttacca tggatgaagaa gtggttgtta ttgatgactt ttatggctgg 660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa 720
gggtggaactg tacctttttt ggccgcagat attctgatta ccagcaatca gacccggtt 780
gaatggtagt cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcgag gattacttcc 840
ttggtatctt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc 900
ctttccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actga 945

```

<210> 12

<211> 702

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo B

<220>

<223> ORF2

<400> 12

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctogtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caagcgaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag ggggggtcaa ccccgctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgacaggg agtgggctcc 360
agtgtgttta ttttagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccacca aacctgtcct agatttctact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttta agacccccca cttaaccctt aa 702

```

<210> 13

<211> 315

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo B

<220>

<223> ORF3

<400> 13

```
atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtgggtt ccgggtctgc 60
aaaattagca gcccatattgc ttttaccaca cccaggtggc cccacaatga cgtgtacatt 120
agtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaatttctg acaaacgtta caggggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtcttc 240
caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccctgagatc taggagctcc 300
acactccatc agtaa                                     315
```

<210> 14

<211> 314

<212> PRT

<213> Circovirus MAP tipo B

<400> 14

[illegible]

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo B

&lt;400&gt; 15

```

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1           5           10           15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
      20           25           30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
      35           40           45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
      50           55           60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
      65           70           75           80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
      85           90           95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
      100          105          110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
      115          120          125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
      130          135          140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
      145          150          155          160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Phe Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
      165          170          175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Glu Thr Ala Gly Asn
      180          185          190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
      195          200          205

Gln Gln Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
      210          215          220

Asn Phe Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
      225          230

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 104



<212> PRT

<213> Circovirus MAP tipo B

<400> 16

```

Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
  1              5              10              15

Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Thr Thr Pro Arg
          20              25              30

Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Ser Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
          35              40              45

Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
          50              55              60

Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
          65              70              75              80

Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
          85              90              95

Ser Arg Ser Ser Thr Leu His Gln
          100

```

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Circovirus MAP tipo B

<400> 17

```

Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly
  1              5              10              15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP tipo B

```

<400> 18

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Gly | Asp | Arg | Gly | Val | Gly | Ser | Ser | Ala | Val | Ile | Leu | Asp | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo B

&lt;400&gt; 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Gly | Ser | Ser | Ala | Val | Ile | Leu | Asp | Asp | Asn | Phe | Val | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP tipo B

&lt;400&gt; 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Asp | His | Val | Gly | Leu | Gly | Thr | Ala | Phe | Glu | Asn | Ser | Ile | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

## **DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

### **Documentos de patente referidos na descrição**

- FR 7810975 [0095]
- FR 2422956 [0096]
- FR 2518755 [0096]
- FR 7921811 [0134]
- WO 9011092 A [0186]
- WO 9511307 A [0186] [0189]
- WO 9427238 A [0187]
- EP 08154913 A [0285]
- FR 9715396 [0285]
- FR 9802634 W [0285]
- EP 98958957 A [0285]

### **Documentos não relacionados com patentes citados na descrição**

- YOUNG, J.A.T. et al. *Sciences*, 1990, vol. 250, 1421-1423 [0199]
- KASAHARA, N. et al. *Sciences*, 1994, vol. 266, 1373-1376 [0199]
- COSSET, F.L. et al. *J. of Virology*, 1995, vol. 69 (10), 6314-6322 [0199]
- VALSESIA-WITTMAN, S. et al. *J. of Virology*, 1996, vol. 70 (3), 2059-2064 [0199]
- TEARINA CHU, T. H. et al. *J. of Virology*, 1997, vol. 71 (1), 720-725 [0199]

- **INUMARU et al.** *Immunol. Cell Biol.*, 1995, vol. 73 (5), 474-476 [0252]
- **ALLAN, G. M. et al.** *Vet. Microbiol.*, 1995, vol. 44, 49-64 [0284]
- **BARANY, F.** *PNAS. USA*, 1911, vol. 88, 189-193 [0284]
- **BOULTON, L.H. et al.** *J. Gen. Virol.*, 1997, vol. 78, 1265-1270 [0284]
- **BUCKHOLZ, R.G.** Yeast systems for the expression of heterologous gene products. *Curr. Op. Biotechnology*, 1993, vol. 4, 538-542 [0284]
- **BURG, J.L. et al.** *Mol. and Cell. Probes*, 1996, vol. 10, 257-271 [0284]
- **CHU, B.C.F. et al.** *NAR*, 1986, vol. 14, 5591-5603 [0284]
- **CHU, P.W.G. et al.** *Virus Research*, 1993, vol. 27, 161-171 [0284]
- **CLARK, E.G.** *American Association of Swine Practitioners*, 1997, 499-501 [0284]
- **DAFT, B. et al.** *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 1996, 32 [0284]
- **DERSE, D. et al.** *J. Virol.*, 1995, vol. 69 (3), 1907-1912 [0284]
- **DUCK, P. et al.** *Biotechniques*, 1990, vol. 9, 142-147 [0284]
- **DULAC, G.C. et al.** *Can. J. Vet. Res.*, 1989, vol. 53, 431-433 [0284]
- **EDWARDS, C.P. ; ARUFFO, A.** Current Applications of COS cell based transient expression systems. *Curr. Op. Biotechnology*, 1993, vol. 4, 558-563 [0284]
- **EDWARDS, S. et al.** *Vet. Rec.*, 1994, vol. 134, 680-681 [0284]
- PCR Technology. **ERLICH, H.A.** Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, 1989 [0284]
- **FELGNER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, vol. 84, 7413 [0284]

- FONTES, E.P.B. et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (11), 8459-8465 [0284]
- FRALEY et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 10431 [0284]
- GUATELI, J.C. et al. *PNAS. USA*, 1990, vol. 87, 1874-1878 [0284]
- HACKLAND, A.F. et al. *Arch. Virol.*, 1994, vol. 139, 1-22 [0284]
- HANSON, S.F. et al. *Virology*, 1995, vol. 211, 1-9 [0284]
- HARDING, J.C. *American Association of Swine Practitioners*, 1997, 503 [0284]
- HARDING, R.M. et al. *Journal of General Virology*, 1993, vol. 74, 323-328 [0284]
- HARDING, J.C. ; CLARK, E.G. *Swine Health and Production*, 1997, vol. 5 (5), 201-203 [0284]
- HEYRAUD-NITSCHKE, F. et al. *Nucleic Acids Research*, 1995, vol. 23 (6) [0284]
- HOMER, G.W. *Surveillance*, 1991, vol. 18 (5), 23 [0284]
- HOUBENWEYL. *Meuthode der Organischen Chemie*. Thieme, 1974 [0284]
- HUYGEN, K. et al. *Nature Medicine*, 1996, vol. 2 (8), 893-898 [0284]
- INNIS, M.A. et al. *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. Académie Press, 1990 [0284]
- KANEDA et al. *Science*, 1989, vol. 243, 375 [0284]
- KIEVITIS, T. et al. *J. Virol. Methods*, 1991, vol. 35, 273-286 [0284]
- KOHLER, G. et al. *Nature*, 1975, vol. 256 (5517), 495-497 [0284]
- KWOH, D.Y. et al. *PNAS. USA*, 1989, vol. 86, 1173-1177 [0284]
- LADANY, S. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, vol. 27, 2778-2783 [0284]
- LAZAROWITZ, S. G. et al. *The EMBO Journal*, 1989, vol. 8 (4), 1023-1032 [0284]

- **LUCKOW, V.A.** Baculovirus systems for the expression of human gene products. *Curr. Op. Biotechnology*, 1993, vol. 4, 564-572 [0284]
- **MANKERTZ, A. et al.** *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 2562-2566 [0284]
- **MATTHEWS, J.A. et al.** *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 169, 1-25 [0284]
- **MCNEILLY, F. et al.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996, vol. 49, 295-306 [0284]
- **MEEHAN, B.M. et al.** *J. Gen. Virol.*, 1997, vol. 78, 221-227 [0284]
- **MERRIFIELD, R.D.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, vol. 88 (21), 5051-5052 [0284]
- **MIDOUX.** *Nucleic Acids Research*, 1993, vol. 21, 871-878 [0284]
- **MIELE, E.A. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1983, vol. 171, 281-295 [0284]
- **MURPHY, F.A. et al.** Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, 1995 [0284]
- **NAYAR, G.P. et al.** *Can. Vet. J.*, 1997, vol. 38 (6), 385-386 [0284]
- **OLINS, P.O.; LEE, S.C.** Recent advances in heterologous gene expression in *E. coli*. *Curr. Op. Biotechnology*, 1993, vol. 4, 520-525 [0284]
- **PAGANO et al.** *J. Virol.*, 1967, vol. 1, 891 [0284]
- **ROLFS, A. et al.** PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease. Springer-Verlag, 1991 [0284]
- **SAMBROOK, J. et al.** Molecular cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0284]
- **SANCHEZ-PESCADOR, R.** *J. Clin. Microbiol.*, 1988, vol. 26 (10), 1934-1938 [0284]

- **SEGEV D.** Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules. Kessler C. Springer Verlag, 1992, 197-205 [0284]
- **SHIVER, J.W.** Vaccines. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, 95-98 [0284]
- **TASCON, R.E et al.** *Nature Medicine*, 1996, vol. 2 (8), 888-892 [0284]
- **TISCHER, I. et al.** *Nature*, 1982, vol. 295, 64-66 [0284]
- **TISCHER, I. et al.** *Arch. Virol.*, 1986, vol. 91, 271-276 [0284]
- **TISCHER, I. et al.** *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 1988, vol. 270, 280-287 [0284]
- **TISCHER, I. et al.** *Arch. Virol.*, 1995, vol. 140, 737-743 [0284]
- **URDEA, M.S.** *Nucleic Acids Research*, 1988, vol. 11, 4937-4957 [0284]
- **WALKER, G.T. et al.** *NAR*, 1992, vol. 20, 1691-1696 [0284]
- **WALKER, G.T. et al.** *PNAS. USA*, 1992, vol. 89, 392-396 [0284]
- **WHITE, B.A. et al.** *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 1997, 67 [0284]
- **ZHAO, T.M. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, vol. 93 (13), 6653-6658 [0284]

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Procedimento para a deteção e/ou identificação numa amostra biológica de um circovírus MAP de tipo B, **caracterizado por** compreender:

- a) colocar em contacto a dita amostra biológica com um polipéptido isolado, codificado por uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 90% de identidade com a sequência SEQ ID N.º 12 e que corresponde à ORF'2 de um circovírus de tipo B, compreendendo o dito polipéptido um epítopo específico do circovírus MAP de tipo B apresentado por pelo menos um polipéptido selecionado a partir da SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19 e SEQ ID N.º 20, e
- b) detetar os complexos de antigénio-anticorpo eventualmente formados.

2. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, em que o dito polipéptido isolado compreende pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19 e SEQ ID N.º 20.

3. Procedimento de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o dito polipéptido é codificado por uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 95% de identidade com a sequência SEQ ID N.º 12.

4. Procedimento de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o dito polipéptido é codificado por uma sequência nucleotídica idêntica à sequência SEQ ID N.º 12.

5. Procedimento de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o dito polipéptido tem uma sequência que tem pelo menos 90% de identidade com a



sequência SEQ ID N.º 15.

6. Procedimento de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, em que o dito polipéptido tem uma sequência idêntica à sequência SEQ ID N.º 15.

7. Kit ou conjunto para a deteção e/ou identificação numa amostra biológica de um circovírus MAP de tipo B, compreendendo:

- a) um polipéptido isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e
- b) um reagente para a criação de um meio propício para a realização de uma reação antigénica.

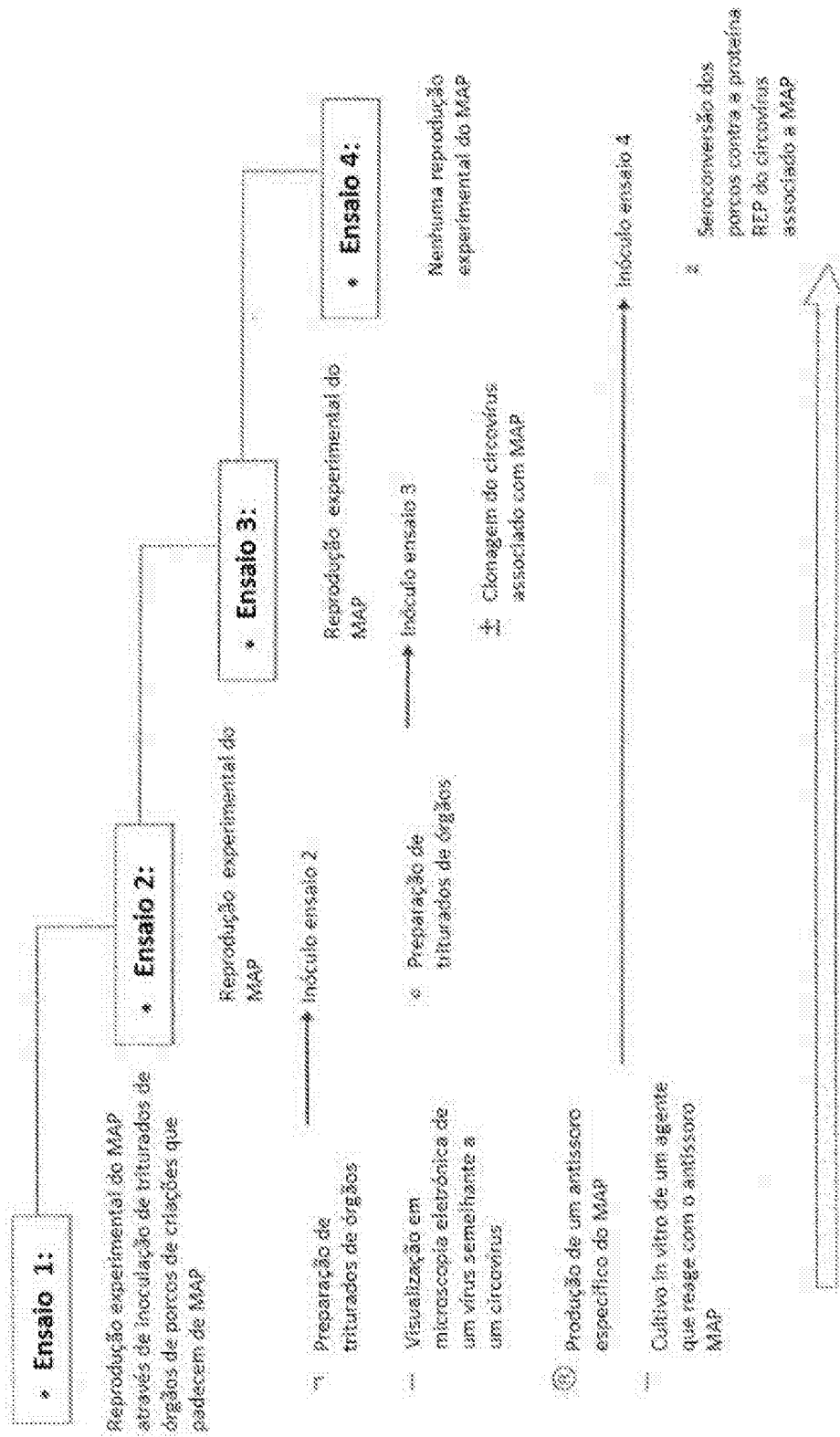


FIGURA 1

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Thr Leu Ser Phe Ala Leu Cys  
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Arg \*\*\* His Phe His Trp Ala  
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Asp Thr Phe Ile Gly Leu  
 3' TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG CAG TCA CTT TTA CGG TTC  
           9          18          27          36          45          54  
 5' ACC AGC GCA CTT CGG CAG CGG CAG CAC CTC GGC AGC GTC AGT GAA AAT GCC AAG  
 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Val Ser Glu Asn Ala Lys  
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Ser Val Lys Met Pro Ser  
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln Arg Gln \*\*\* Lys Cys Gln Ala  
  
 Ser Phe Arg Gly Ala Val Gly Tyr Ser Thr Pro Thr \*\*\* Gly \*\*\* Tyr Asp Lys  
 Leu Phe Ala Arg Leu Gly Met Leu Pro Pro His Glu Gly Lys Ile Ile Arg  
 Leu Phe Leu Pro Gly Cys Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val Arg Leu Leu Gly  
 GTT CTT TTC GGC GGG CGT TGG GGT ATT CTC CAC CCA CAA GTG CGA ATT ATT AGG  
           63          72          81          90          99          108  
 CAA GAA AAG CGG CCC GCA ACC CCA TAA GAG GTG GGT GTT CAC CCT TAA TAA TCC  
 Gln Glu Lys Arg Pro Ala Thr Pro \*\*\* Glu Val Gly Val His Pro \*\*\* \*\*\* Ser  
 Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro  
 Arg Lys Ala Ala Arg Asn Pro Ile Arg Gly Gly Cys Ser Pro Leu Ile Ile Leu  
  
 Arg Pro Pro Ser Phe Cys Phe Val Pro Ala Glu Leu Arg Gly Lys Gln Asn Asn  
 Gly Leu Leu Leu Phe Val Phe Tyr Pro Leu Lys Trp Asp Gly Lys Lys Ile Ile  
 Glu Ser Ser Ser Phe Phe Leu Ile Arg Ser Ser Gly Ile Glu Arg Lys Ser \*\*\*  
 AAG GCT CCT CTT CTT TTT GTT TTA TGC CCT CGA AGG TTA GAG GGA AAA ACT AAT  
           117          126          135          144          153          162  
 TTC CGA GGA GGA GAA AAA CAA AAT ACG GGA GGT TCC AAT CTC CCT TTT TCA TTA  
 Phe Arg Gly Gly Glu Lys Gln Asn Thr Gly Ala Ser Asn Leu Pro Phe \*\*\* Leu  
 Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr  
 Pro Arg Arg Arg Lys Thr Lys Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Pro Phe Leu Ile Ile  
  
 Gln Lys His Arg Pro Leu Asn Pro Leu Pro Tyr Phe Glu Glu Gly Gly Pro Thr  
 Lys Asn Thr Ala Leu Phe Thr Gln Phe Leu Thr Ser Ser Arg Val Glu Leu Pro  
 Lys Thr Gln Pro Ser Ser Pro Lys Ser Ser Pro Leu Val Gly \*\*\* Arg Trp Pro  
 AAA ACA AAC ACC GCT CCT TCC AAA CCT TCT CCC ATC TTG AGG AGT GGA GGT CCC  
           171          180          189          198          207          216  
 TTT TGT TTG TGG CGA GGA AGG TTT GGA AGA GGG TAG AAC TCC TCA CCT CCA GGG  
 Phe Cys Leu Trp Arg Gly Arg Phe Gly Arg Gly \*\*\* Asn Ser Ser Pro Pro Gly  
 Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly  
 Leu Phe Val Ala Arg Lys Val Trp Lys Arg Val Glu Leu Leu Thr Ser Arg Gly  
  
 Gln Ser Asn Gln \*\*\* Ser Ala Ser Lys \*\*\* Cys Pro Ser Thr Thr Asn Gln His  
 Lys Arg Ile Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys Val Leu His Leu Pro Ile Lys Thr  
 Asn Ala Phe Lys Ala Leu Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe His Tyr Lys Pro  
 CAA ACG CTT AAA ACG ATT CTT CTT CTG AAA ATT GTT CCA CTT CAC CAT AAA ACC  
           225          234          243          252          261          270  
 GTT TGC GAA TTT TGC TAA GAA GCA GAC TTT TAA CAA CGT GAA GTG GTA TTT TGG  
 Val Cys Glu Phe Cys \*\*\* Glu Ala Asp Phe \*\*\* Gln Gly Glu Val Val Phe Trp  
 Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly  
 Leu Arg Ile Leu Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Arg \*\*\* Ser Gly Ile Leu Val

FIGURA 2

Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Ser  
 Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Gly Val Leu Leu Ile Phe Phe Val  
 Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser Trp Cys Phe Leu Ser Tyr  
 ---  
 ACG GGC GAC GGT GTA GCT CTT TCG CTT TCC TTG GCT GGT CGT CTT ATT TCT TAT  
 279 288 297 306 315 324  
 TGC CCG CTG CCA CAT CGA GAA AGC GAA AGG AAC CCA CCA GCA GAA TAA AGA ATA  
 ---  
 Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Pro Ala Glu \*\*\* Arg Ile  
 Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr  
 Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Pro Thr Ser Arg Ile Lys Asn Thr

Cys Tyr Leu Leu Gly Cys Val \*\*\* Arg Thr His Leu Glu Ala Ser Gly Pro Ser  
 Ala Thr Phe Phe Ala Val Tyr Lys Asp Leu Thr Ser Ser Arg Pro Val Leu Pro  
 Gln Leu Leu Ser Pro Trp Met Ser Ile Ser His Pro Ala Gly Arg Phe Trp Pro  
 ---  
 GAC GTC ATT TCT TCC GGT GTA TGA ATA GCT CAC ACC TCG AGG CGC CTT GGT CCC  
 333 342 351 360 369 378  
 CTG CAG TAA AGA AGG CCA CAT ACT TAT CGA GTG TGG AGC TCC GCG GAA CCA GGG  
 ---  
 Leu Gln \*\*\* Arg Arg Pro His Thr Tyr Arg Val Trp Ser Ser Ala Glu Pro Gly  
 Cys Ser Lys Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly  
 Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Val Glu Leu Arg Gly Thr Arg Gly

Ala Cys Arg Gly Thr \*\*\* Gln Gln Ser Tyr Gly Lys Pro Ser Pro Thr Lys Pro  
 Leu Ala Ala Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Lys Gln Leu Arg Pro Arg Gln  
 Phe Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Arg Lys Ser Val Pro Asp Lys  
 ---  
 CTT CGC GTC GCT GGA CAG ATG ACG ACA CTC ATG GGA AAA CCT CTC CCC CAG AAA  
 387 396 405 414 423 432  
 GAA GCG CAG CGA CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CCT TTT GGA CAC GGG GTC TTT  
 ---  
 Glu Ala Gln Arg Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Pro Phe Gly Asp Gly Val Phe  
 Lys Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser Leu  
 Ser Ala Ala Thr Cys Leu Leu Leu \*\*\* Val Pro Phe Trp Arg Arg Gly Leu Trp

Ser Gln Leu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Thr His Ser Phe Asn Gly Arg Ala Pro  
 His Ser Tyr Gly Leu Leu Lys Arg Tyr Arg Ile His Ser Ile Glu Ala Pro Gln  
 Thr Val Thr Ala Ser Cys Asn Gly Thr Val Tyr Thr Leu Phe Lys Arg Pro Ser  
 ---  
 CCA CTG ACA TCG GCT CGT CAA AGG ACA TGG CAT ACA CTC TTT AAA GGC GCC CGA  
 441 450 459 468 477 486  
 GGT GAC TGT AGC CGA GCA GTT TCC TGT AAC GTA TGT GAG AAA TTT CCG CGG GCT  
 ---  
 Gly Asp Cys Ser Arg Ala Val Ser Cys Asn Val Cys Glu Lys Phe Pro Arg Ala  
 Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe Arg Gly Leu  
 \*\*\* Leu \*\*\* Pro Ser Ser Phe Leu \*\*\* Arg Met \*\*\* Glu Ile Ser Ala Gly Trp

Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala His Asn Ser Ser Leu Gln  
 Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Leu His Leu Leu Thr Ile Pro Leu Cys Ser  
 Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Cys Arg Ser Gln Phe Val Ala  
 ---  
 CCG ACT TGA AAA CTT TCA CTC GCC CTT CTA CGT CGT CGC ACT AAC CTT CTG TCG  
 495 504 513 522 531 540  
 GGC TGA ACT TTT GAA AGT GAG CGG GAA GAT GCA GCA GCG TGA TTG GAA GAC AGC  
 ---  
 Gly \*\*\* Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asp Ala Ala Ala \*\*\* Leu Glu Asp Ser  
 Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg Asp Trp Lys Thr Ala  
 Leu Asn Phe \*\*\* Lys \*\*\* Ala Gly Arg Cys Ser Ser Val Ile Gly Arg Gln Leu

FIGURA 2 (Continuação 1)

Val Arg \*\*\* Leu Pro Gly Ala Arg Asn His Ser Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Asn  
Tyr Val Asp Tyr His Ala Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Leu Pro Gly Thr Ile  
Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro Gln Pro Phe Leu Trp His Ala Arg Leu  
---  
ACA TGT GCA GTA TCA CCC GGG CGG GCC AAC ACC CTT CTC GGT CAC CCG GGC ATT  
549 558 567 576 585 594  
TGT ACA CGT CAY AGT GGG CCC GCC CGG TTG TGG GAA GAG CCA GTG GGC CCG TAA  
---  
Cys Thr Arg His Ser Gly Pro Ala Arg Leu Trp Glu Glu Pro Val Gly Pro \*\*\*  
Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn  
Tyr Thr Ser \*\*\* Trp Ala Arg Pro Val Val Gly Arg Ala Ser Gly Pro Val Ile

Gln Gln Ala \*\*\* Pro Cys Arg Ser Ser Ala \*\*\* Tyr Phe Tyr Thr Thr Pro His  
Lys Ser Leu Arg Pro Val Gly Val Pro Leu Arg Thr Ser Ile Leu Pro Pro Ile  
Lys Ala Ser Gly Leu Ser Val \*\*\* Gln Phe Gly Leu Leu Phe Leu His His Ser  
---  
AAA ACG ACT CGG ATC CCT GTG GAT GAC CTT CGG ATC ATC TTT ATT CAC CAC CCT  
603 612 621 630 639 648  
TTT TGC TGA GCC TAG GGA CAC CTA CTG GAA GCC TAG TAG AAA TAA GTG GTG GGA  
---  
Phe Cys \*\*\* Ala \*\*\* Gly His Leu Leu Glu Ala \*\*\* Lys \*\*\* Val Val Gly  
Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp  
Leu Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Gly Ser Leu Val Glu Ile Ser Gly Gly Met

Ile Asp His Leu Leu Leu Gln Gln Lys Pro His Asn Lys His Ser Thr Val Lys  
Ser Ile Met Ser Phe Phe Asn Asn Asn Gln Ile Ile Lys Ile Ala Pro \*\*\* Arg  
Pro Tyr \*\*\* Pro Ser Ser Thr Thr Thr Lys Ser Ser Lys \*\*\* Pro Gln Asn Gly  
---  
ACC TAT AGT ACC TCT TCT TCA ACA ACA AAA CCT ACT AAA AAT ACC GAC CAA TGG  
657 666 675 684 693 702  
TGG ATA TCA TGG AGA AGA AGT TGT TGT TTT GGA TGA TTT TTA TGG CTG GTT ACC  
---  
Trp Ile Ser Trp Arg Arg Ser Cys Cys Phe Gly \*\*\* Phe Leu Trp Leu Val Thr  
Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro  
Asp Ile Met Glu Lys Lys Leu Leu Phe Trp Met Ile Phe Met Ala Gly Tyr Leu

Pro His Asp Val Ser Val Thr His Gly Thr Asp Met Ser Gln Leu Ser \*\*\* Leu  
Pro Ile Ile \*\*\* Gln Ser Gln Thr Val Pro Ile Trp Gln Ser Tyr Leu Ser Phe  
Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val Thr Ser Val Leu  
---  
AAC CCT ACT AGA TGA CTC TGA CAC ACT GGC CAT AGG TAA CTG ACA TCT CTG ATT  
711 720 729 738 747 756  
TTG GGA TGA TCT ACT GAG ACT GTG TGA CCG GTA TCC ATT GAC TGT AGA GAC TAA  
---  
Leu Gly \*\*\* Ser Thr Glu Thr Val \*\*\* Pro Val Ser Ile Asp Cys Arg Asp \*\*\*  
Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys  
Gly Met Ile Tyr \*\*\* Asp Cys Val Thr Gly Ile His \*\*\* Leu \*\*\* Arg Leu Lys

Pro Tyr Gln Glu Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Lys Ser \*\*\* Trp Cys Asp Pro Gly  
Pro Thr Ser Asn Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly Ala Ile Leu Gly  
Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Lys Ile Val Leu Leu \*\*\* Ala  
---  
TCC CCC ATG ACA AGG AAA AAA CCG GGC GTC ATA AAA CTA ATG GTC GTT AGT CCG  
765 774 783 792 801 810  
AGG GCG TAC TCT TCC TTT TTT GGC CCG CAG YAT TTT GAT TAC CAG CAA TCA GGC  
---  
Arg Gly Tyr Cys Ser Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Phe Asp Tyr Gln Gln Ser Gly  
Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala  
Gly Val Leu Phe Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe \*\*\* Leu Pro Ala Ile Arg Pro

FIGURA 2 (Continuação 2)

Gly Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu Leu Glu Arg Asp Ser  
 Gly Leu Phe Pro Val Gly \*\*\* Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe Ser Glu Ile Pro  
 Gly Trp Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser Ala Arg \*\*\* Arg  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GGG GGT CCT TAC CAT GAG GAG TTG ACG ACA GGG TCG ACA TCT TCG AGA GAT AGC  
 819 828 837 846 855 864  
 CCC CCA GGA ATG GTA CTC CTC AAC TGC TGT CCC AGC TGT AGA AGC TCT CTA TCG  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Pro Pro Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser  
 Pro Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr Arg  
 Pro Arg Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu \*\*\* Lys Leu Ser Ile Gly

Ser \*\*\* \*\*\* Lys Ala Ile Lys Ser Ser Gln Gln Leu Val Ile Trp Pro Pro Val  
 Pro Asn Ser Ser Gln Leu Lys Pro Leu Ser Ser Ser Phe Leu Gly Arg Leu Tyr  
 Leu Ile Val Val Lys Cys Asn Gln Phe Val Ala Pro Ser Cys Asp Val Ser Thr  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 CTC CTA ATG ATG AAA CGT TAA AAC CTT CTG ACG ACC TCT TGT TAG GTG CCT CCA  
 873 882 891 900 909 918  
 GAG GAT TAC TAC TTT GCA ATT TTG GAA GAC TGC TGG AGA ACA ATC CAC GGA GGT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Glu Asp Tyr Tyr Phe Ala Ile Leu Glu Asp Cys Trp Arg Thr Ile His Gly Gly  
 Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser Thr Glu Val  
 Gly Leu Leu Leu Cys Asn Phe Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro Arg Arg Tyr

Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Gly Val Arg His Gly Lys Gly Met Tyr Phe  
 Gly Phe Ala Ser Lys Phe Cys His Val Trp Gly Thr Gly Lys Glu Trp Ile Phe  
 Gly Ser Pro Arg Asn Ser Ala Thr Ser Gly Gly Gln Ala Arg Lys Gly Tyr Leu  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TGG GCT TCC GGC TAA ACT TCG TCA CCT GGG TGG GAC ACG GGA AAA GGG TAT ATT  
 927 936 945 954 963 972  
 ACC CGA AGG CCG ATT TGA AGC AGT GGA CCC ACC CTG TGC CCT TTT CCC ATA TAA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Thr Arg Arg Pro Ile \*\*\* Ser Ser Gly Pro Thr Leu Cys Pro Phe Pro Ile \*\*\*  
 Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala Leu Phe Pro Tyr Lys  
 Pro Lys Ala Asp Leu Lys Gln Trp Thr His Pro Val Pro Phe Ser His Ile Lys

Leu Asn Ser Leu Arg Lys Gln \*\*\* \*\*\* Met Thr Ile Thr Lys Ile Lys Ile \*\*\*  
 Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asn Asp Cys Arg Leu Pro Lys \*\*\* Lys \*\*\* Glu  
 Ile Phe \*\*\* Gln Thr Lys Lys Thr Ile Val Asp Tyr His Asn Lys Asn Lys Asn  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TTA TTT AAT GAC TCA GAA AAA ACA ATA GTG TAG CAT TAC CAA AAA TAA AAA TAA  
 981 990 999 1008 1017 1026  
 AAT AAA TTA CTG AGT CTT TTT TGT TAT CAC ATC GTA ATG GTT TTT ATT TTT ATT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Cys Tyr His Ile Val Met Val Phe Ile Phe Ile  
 Ile Asn Tyr \*\*\* Val Phe Phe Val Ile Thr Ser \*\*\* Trp Phe Leu Phe Leu Phe  
 \*\*\* Ile Thr Glu Ser Phe Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Phe Tyr Phe Tyr Ser

Lys Ser Pro Arg Glu Pro Tyr Ile Arg Gln Ile Thr Cys Leu Tyr Asp Val Lys  
 Asn Leu Pro Asp Lys Leu Ile Phe Glu Arg Phe Gln Val Tyr Ile Thr Leu Arg  
 Met \*\*\* Leu Thr Lys \*\*\* Ser Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met Phe Leu \*\*\* Gly  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GTA AAT CTC CCA GAA AGT CCT ATT TAA GAG ACT TAA CAT GTA TTT ATC AGT TGG  
 1035 1044 1053 1062 1071 1080  
 CAT TTA GAG GGT CTT TCA GGA TAA ATT CTC TGA ATT GTA CAT AAA TAG TCA ACC  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 His Leu Glu Gly Leu Ser Gly \*\*\* Ile Leu \*\*\* Ile Val His Lys \*\*\* Ser Thr  
 Ile \*\*\* Arg Val Phe Gln Asp Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile Asn Ser Gln Pro  
 Phe Arg Gly Ser Phe Arg Ile Asn Ser Leu Asn Cys Thr \*\*\* Ile Val Asn Leu

FIGURA 2 (Continuação 3)

Gly Cys Leu Lys Pro Ser His Asn Cys Lys Pro Ala Cys Leu Gly Pro Arg His  
 Val Val Tyr Asn Gln Ala Thr Thr Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Gly Leu Gly Thr  
 \*\*\* Trp Met Ile Lys Pro Gln Pro Gln Met Lys Ser Arg Met Ala Trp Ala Gln  
 ---  
 AAT GGT GTA TTA AAA CCC GAC ACC AAC GTA AAA CCT CGC GTA TCG GGT CCG GAC  
 1089 1098 1107 1116 1125 1134  
 TTA CCA CAT AAT TTT GGG CTG TGG TTG CAT TTT GGA GCG CAT AGC CCA GCG CTG  
 ---  
 Leu Pro His Asn Phe Gly Leu Trp Leu His Phe Gly Ala His Ser Pro Gly Leu  
 Tyr His Ile Ile Leu Gly Cys Gly Cys Ile Leu Glu Arg Ile Ala Gln Ala Cys  
 Thr Thr \*\*\* Phe Trp Ala Val Val Ala Phe Trp Ser Ala \*\*\* Pro Arg Pro Val

Ala Arg Cys Gln His Pro Tyr Lys Phe Pro Ala Val Ala Pro Lys Lys \*\*\* \*\*\*  
 His Glu Val Asn Thr His Thr Asn Leu His Leu Trp Leu Gln Asn Arg Lys Asn  
 Thr Ser Ser Met Pro Thr Pro Ile \*\*\* Ile Ser Gly Cys Ser Thr Glu Lys Ile  
 ---  
 ACA CGA GCT GTA ACC ACA CCC ATA AAT TTA CCT CGG TGT CGA CCA AAG AAA ATA  
 1143 1152 1161 1170 1179 1188  
 TGT GCT CGA CAT TGG TGT GGG TAT TTA AAT GGA GCC ACA GCT GGT TTC TTT TAT  
 ---  
 Cys Ala Arg His Trp Cys Gly Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Ala Gly Phe Phe Tyr  
 Val Leu Asp Ile Gly Val Gly Ile \*\*\* Met Glu Pro Gln Leu Val Ser Phe Ile  
 Cys Ser Thr Leu Val Trp Val Phe Lys Trp Ser His Ser Trp Phe Leu Leu Leu

Lys Ala Pro Val Leu \*\*\* Asn Asn Pro Arg Ala Arg Thr Gln Pro His Leu Val  
 Asn Pro Gln Phe Trp Asp Ile Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys Pro Thr Phe Tyr  
 Ile Gln Ser Ser Gly Ile Leu Gln Lys Thr \*\*\* Ser Gln Asn Pro Pro Ser Thr  
 ---  
 ATA AAC CGA CCT TGG TTA GTT AAC AAA CCA GAT CGA GAC CAA ACC CCC ACT TCA  
 1197 1206 1215 1224 1233 1242  
 TAT TTG GCT GGA ACC AAT CAA TTG TTT GGT CTA GCT CTG GTT TGG GGG TGA AGT  
 ---  
 Tyr Leu Ala Gly Thr Asn Gln Leu Phe Gly Leu Ala Leu Val Trp Gly \*\*\* Ser  
 Ile Trp Leu Glu Pro Ile Asn Cys Leu Val \*\*\* Leu Trp Phe Gly Gly Glu Val  
 Phe Gly Trp Asn Gln Ser Ile Val Trp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Val Lys Tyr

Gln Leu Pro Leu Tyr Leu Ala Ala Lys His His Pro Pro Leu Leu Leu \*\*\* Tyr  
 Arg Ser His Tyr Thr Phe Pro Gln Arg Ile Thr His Arg Ser Ser Tyr Asn Ile  
 Gly Pro Thr Thr Pro Leu Pro Ser Gly \*\*\* Pro Thr Ala Pro Pro Thr Thr Leu  
 ---  
 TGG ACC TCA CCA TCC ATT TCC CGA CGG AAT ACC ACA CCG CCC TCC TCA TCA ATT  
 1251 1260 1269 1278 1287 1296  
 ACC TGG AGT GGT AGG TAA AGG GCT GCC TTA TGG TGT GGC GGG AGG AGT AGT TAA  
 ---  
 Thr Trp Ser Gly Arg \*\*\* Arg Ala Ala Leu Trp Cys Gly Gly Arg Ser Ser \*\*\*  
 Pro Gly Val Val Gly Lys Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala Gly Gly Val Val Asn  
 Leu Glu Trp \*\*\* Val Lys Gly Cys Leu Met Val Trp Arg Glu Glu \*\*\* Leu Ile

Leu Pro \*\*\* Leu Gly Leu Gln His Leu Pro Asn Cys Leu Gln Cys Gly Leu Tyr  
 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Asn Thr Ser Pro Thr Val Phe Asn Ala Asp Leu Ile  
 Ile Pro Thr Met Pro Trp Thr Pro Pro Pro Pro \*\*\* Leu Thr Pro Met Trp Ser  
 ---  
 ATA TCC CCA GTA TCC GGT TCA ACC ACC TCC CCC AAT GTT TCA ACC GTA GGT TCT  
 1305 1314 1323 1332 1341 1350  
 TAT AGG GGT CAT AGG CCA AGT TGG TGG AGG GGG TTA CAA AGT TGG CAT CCA AGA  
 ---  
 Tyr Arg Gly His Arg Pro Ser Trp Trp Arg Gly Leu Gln Ser Trp His Pro Arg  
 Ile Gly Val Ile Gly Gln Val Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Val Gly Ile Gln Asp  
 \*\*\* Gly Ser \*\*\* Ala Lys Leu Val Glu Gly Val Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ile

FIGURA 2 (Continuação 4)

Cys Cys His Val Trp Cys Arg Lys Ser \*\*\* Leu His His Pro Arg Gln Pro Leu  
 Val Val Thr Ser Gly Val Gly Arg Gln Asn Ser Thr Ile Pro Asp Arg Pro Tyr  
 Leu Leu Leu Pro Gly Leu Val Glu Lys Ile Leu Pro Ser Pro Thr Glu Pro Thr  
 ---  
 ATT GTT GTC ACC TGG GTT GTG GAG AAA CTA ATC TCC ACT ACC CCA GAG ACC CCA  
 1359 1368 1377 1386 1395 1404  
 TAA CAA CAG TGG ACC CAA CAC CTC TTT GAT TAG AGG TGA TGG GGT CTC TGG GGT  
 ---  
 \*\*\* Gln Gln Trp Thr Gln His Leu Phe Asp \*\*\* Arg \*\*\* Trp Gly Leu Trp Gly  
 Asn Asn Ser Gly Pro Asn Thr Ser Leu Ile Arg Gly Asp Gly Val Ser Gly Val  
 Thr Thr Val Asp Pro Thr Pro Leu \*\*\* Leu Glu Val Met Gly Ser Leu Gly \*\*\*

Ile \*\*\* Ile \*\*\* Gly Lys \*\*\* Tyr Pro Leu Ile Pro Phe Thr Pro Thr Pro Pro  
 Phe Glu Tyr Lys Ala Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Leu Pro  
 Phe Asn Met Asn Leu Arg Glu Leu Val Thr Thr Asn Ser Leu Tyr Pro Tyr Pro  
 ---  
 TTT TAA GTA TAA ATC GGA AAG ATT ATG CCA TCA TAA CCT TTC CAT CCC CAT CCC  
 1413 1422 1431 1440 1449 1458  
 AAA ATT CAT ATT TAG CCT TTC TAA TAC GGT AGT ATT GGA AAG GTA GGG GTA GGG  
 ---  
 Lys Ile His Ile \*\*\* Pro Phe \*\*\* Tyr Gly Ser Ile Gly Lys Val Gly Val Gly  
 Lys Phe Ile Phe Ser Leu Ser Asn Thr Val Val Leu Glu Arg \*\*\* Gly \*\*\* Gly  
 Asn Ser Tyr Leu Ala Phe Leu Ile Arg \*\*\* Tyr Trp Lys Gly Arg Gly Arg Gly

Gln His Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Pro Arg His Gln Ile Glu Ala Arg \*\*\*  
 Asn Thr Gly Gly Ser Pro Pro Leu Phe Gln Gly Ile Asn Phe Arg Leu Glu Asn  
 Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ser Thr Ser Asp \*\*\* Ser Thr  
 ---  
 CCA ACC ACC GCG GAC TCC CCC CCT CCT TGA CCG GCT ACA ACT TAG AGT CGA GCA  
 1467 1476 1485 1494 1503 1512  
 GGT TGG TCC CGC CTG AGG GGG GGA GCA ACT GGC CGA TGT TGA ATC TCA GCT COT  
 ---  
 Gly Trp Cys Arg Leu Arg Gly Gly Gly Thr Gly Arg Cys \*\*\* Ile Ser Ala Arg  
 Val Gly Ala Ala \*\*\* Gly Gly Glu Glu Leu Ala Asp Val Glu Ser Gln Leu Val  
 Leu Val Pro Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp Pro Met Leu Asn Leu Ser Ser Leu

Cys Glu Leu Ile Ala Ala Leu Thr Arg Arg Lys His His Thr Cys Ile Arg \*\*\*  
 Val Asn Trp Ser Pro Gln Ser His Gly Gly Arg Ile Thr Leu Val Phe Glu Arg  
 Leu Met Gly Leu His Ser Arg Thr Asp Glu Glu \*\*\* Pro Ser Tyr Leu Asn Glu  
 ---  
 ATT GTA AGG TTC TAC CGA CGC TCA CAG GAG GAG AAT ACC ACT CAT GTT TAA GAG  
 1521 1530 1539 1548 1557 1566  
 TAA CAT TCC AAG ATG GCT GCC AGT GTC CTC CTC TTA TGG TGA GTA CAA ATT CTC  
 ---  
 \*\*\* His Ser Lys Met Ala Ala Ser Val Leu Leu Leu Trp \*\*\* Val Gln Ile Leu  
 Asn Ile Pro Arg Trp Leu Arg Val Ser Ser Ser Tyr Gly Glu Tyr Lys Phe Ser  
 Thr Phe Gln Asp Gly Cys Glu Cys Pro Pro Leu Met Val Ser Thr Asn Ser Leu

Phe Pro Pro Phe Gln Leu Tyr Gly Asp Lys Pro Ala Met Gln Leu Pro Lys Gln  
 Ser Leu Arg Ser Asn Phe Ile Gly Thr Lys Arg Arg Trp Arg Tyr Arg Asn Arg  
 Leu Phe Ala Pro Ile Ser Ser Val Arg Arg Glu Ala Gly Asp Thr Val Thr Glu  
 ---  
 ATC TTT CCG CCC TTA ACT TCT ATG GGC AGA AAG CCG CGG TAG ACA TTG CCA AAG  
 1575 1584 1593 1602 1611 1620  
 TAG AAA GGC GGG AAT TGA AGA TAC CCG TCT TTC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TTC  
 ---  
 \*\*\* Lys Gly Gly Asn \*\*\* Arg Tyr Pro Ser Phe Gly Ala Ile Cys Asn Gly Phe  
 Arg Lys Ala Gly Ile Glu Asp Thr Arg Leu Ser Ala Pro Ser Val Thr Val Ser  
 Glu Arg Arg Glu Leu Lys Ile Pro Val Phe Arg Arg His Leu \*\*\* Arg Phe Leu

FIGURA 2 (Continuação 5)



```

Leu Arg Pro Thr Gly Phe Ile Thr Lys Glu Pro Pro His Lys Trp Ser Pro Gln
Phe Ala Pro His Val Leu Tyr Pro Arg Arg Arg Leu Ile Asn Gly Leu His Ser
Ser Pro Pro Thr Tyr Trp Ile His Asp Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Ile Ala
---
ACT TCC GCC CCA CAT GGT TTA TAC CAG AAG AGG CCT CCT ACA AAG GTT CTA CCG
1629      1638      1647      1656      1665      1674
TGA AGG CGG GGT GTA CCA AAT ATG GTC TTC TCC GGA GGA TGT TTC CAA GAT GGC
---
*** Arg Arg Gly Val Pro Asn Met Val Phe Ser Gly Gly Cys Phe Gln Asp Gly
Glu Gly Gly Val Tyr Gln Ile Trp Ser Ser Pro Glu Asp Val Ser Lys Met Ala
Lys Ala Gly Cys Thr Lys Tyr Gly Leu Leu Arg Arg Met Phe Pro Arg Trp Leu

Pro Pro Pro Asp Thr Lys Gln Pro Leu Ala Glu Lys Ala Val Asp Asp *** Leu
Arg Pro Arg Thr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Trp Thr Met Arg Tyr
Ala Pro Ala Pro Gly Asp Glu Ala Thr Val Gly Gly Gln Gly Arg *** Gly Ile
---
ACG CCC CCG CCC AGG CAG AAG ACG CCA TTG CGG AGC AAC CGG TGC AGT AGC ATA
1683      1692      1701      1710      1719      1728
TGC GGG GGC GGG TCC GTC TTC TGC GGT AAC GCC TCC TTG GCC ACG TCA TCC TAT
---
Cys Gly Gly Gly Ser Val Phe Cys Gly Asn Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ser Tyr
Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Ala Val Thr Pro Pro Trp Pro Arg His Pro Ile
Arg Gly Arg Val Arg Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly His Val Ile Leu ***

Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ser Tyr Tyr
Phe His Phe Phe His Ala Ala Thr Thr Asn
Phe Thr Phe Ser Thr Arg Gln Gln Leu Ile
---
TTT TCA CTT TCT TCA CGC GAC GAC ATC ATA A 5'
1737      1746      1755
AAA AGT GAA AGA AGT GCG CTG CTG TAG TAT T 3'
---
Lys Ser Glu Arg Ser Ala Leu Leu *** Tyr
Lys Val Lys Glu Val Arg Cys Cys Ser Ile
Lys *** Lys Lys Cys Ala Ala Val Val

```

FIGURA 2 (Continuação 6)

|              |     |            |           |           |           |           |     |
|--------------|-----|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|
|              |     | 10         | 20        | 30        | 40        | 50        |     |
| circopormank | 1   | ACCAGGGAG  | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 50  |
| circopormeeh | 1   | ACCAGGGAG  | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 50  |
| circopordfp  | 1   | ACCAGGGAG  | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 50  |
|              |     | 60         | 70        | 80        | 90        | 100       |     |
| circopormank | 51  | ATAGGAGAA  | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 100 |
| circopormeeh | 51  | ATAGGAGAA  | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 100 |
| circopordfp  | 51  | ATAGGAGAA  | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 100 |
|              |     | 110        | 120       | 130       | 140       | 150       |     |
| circopormank | 101 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 150 |
| circopormeeh | 101 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 150 |
| circopordfp  | 101 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 150 |
|              |     | 160        | 170       | 180       | 190       | 200       |     |
| circopormank | 151 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 200 |
| circopormeeh | 151 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 200 |
| circopordfp  | 151 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 200 |
|              |     | 210        | 220       | 230       | 240       | 250       |     |
| circopormank | 201 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 250 |
| circopormeeh | 201 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 250 |
| circopordfp  | 201 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 250 |
|              |     | 260        | 270       | 280       | 290       | 300       |     |
| circopormank | 251 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 300 |
| circopormeeh | 251 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 300 |
| circopordfp  | 251 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 300 |
|              |     | 310        | 320       | 330       | 340       | 350       |     |
| circopormank | 301 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 350 |
| circopormeeh | 301 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 350 |
| circopordfp  | 301 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 350 |
|              |     | 360        | 370       | 380       | 390       | 400       |     |
| circopormank | 351 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 400 |
| circopormeeh | 351 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 400 |
| circopordfp  | 351 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 400 |
|              |     | 410        | 420       | 430       | 440       | 450       |     |
| circopormank | 401 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 450 |
| circopormeeh | 401 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 450 |
| circopordfp  | 401 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 450 |
|              |     | 460        | 470       | 480       | 490       | 500       |     |
| circopormank | 451 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 500 |
| circopormeeh | 451 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 500 |
| circopordfp  | 451 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 500 |
|              |     | 510        | 520       | 530       | 540       | 550       |     |
| circopormank | 501 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 550 |
| circopormeeh | 501 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 550 |
| circopordfp  | 501 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 550 |
|              |     | 560        | 570       | 580       | 590       | 600       |     |
| circopormank | 551 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 600 |
| circopormeeh | 551 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 600 |
| circopordfp  | 551 | ATATATGCTT | ATCGGAGGG | ATATAGCTT | ATGAGGTTT | ATGAAATGC | 600 |

FIGURA 3

|              |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|
| circopormank | 601  | 610  | 620  | 630  | 640  | 650  |      |
| circopormeeh | 601  | 610  | 620  | 630  | 640  | 650  | 650  |
| circopordfp  | 601  | 610  | 620  | 630  | 640  | 650  | 650  |
| circopormank | 651  | 660  | 670  | 680  | 690  | 700  |      |
| circopormeeh | 651  | 660  | 670  | 680  | 690  | 700  | 700  |
| circopordfp  | 651  | 660  | 670  | 680  | 690  | 700  | 700  |
| circopormank | 701  | 710  | 720  | 730  | 740  | 750  |      |
| circopormeeh | 701  | 710  | 720  | 730  | 740  | 750  | 750  |
| circopordfp  | 701  | 710  | 720  | 730  | 740  | 750  | 750  |
| circopormank | 751  | 760  | 770  | 780  | 790  | 800  |      |
| circopormeeh | 751  | 760  | 770  | 780  | 790  | 800  | 800  |
| circopordfp  | 751  | 760  | 770  | 780  | 790  | 800  | 800  |
| circopormank | 801  | 810  | 820  | 830  | 840  | 850  |      |
| circopormeeh | 801  | 810  | 820  | 830  | 840  | 850  | 850  |
| circopordfp  | 801  | 810  | 820  | 830  | 840  | 850  | 850  |
| circopormank | 851  | 860  | 870  | 880  | 890  | 900  |      |
| circopormeeh | 851  | 860  | 870  | 880  | 890  | 900  | 900  |
| circopordfp  | 851  | 860  | 870  | 880  | 890  | 900  | 900  |
| circopormank | 901  | 910  | 920  | 930  | 940  | 950  |      |
| circopormeeh | 901  | 910  | 920  | 930  | 940  | 950  | 950  |
| circopordfp  | 901  | 910  | 920  | 930  | 940  | 950  | 950  |
| circopormank | 951  | 960  | 970  | 980  | 990  | 1000 |      |
| circopormeeh | 951  | 960  | 970  | 980  | 990  | 1000 | 1000 |
| circopordfp  | 951  | 960  | 970  | 980  | 990  | 1000 | 1000 |
| circopormank | 1001 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 |      |
| circopormeeh | 1001 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1050 |
| circopordfp  | 1001 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1050 |
| circopormank | 1051 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |      |
| circopormeeh | 1051 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1100 |
| circopordfp  | 1051 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1100 |
| circopormank | 1101 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 |      |
| circopormeeh | 1101 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1150 |
| circopordfp  | 1101 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1150 |
| circopormank | 1151 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |      |
| circopormeeh | 1151 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 | 1200 |
| circopordfp  | 1151 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 | 1200 |

FIGURA 3 (Continuação 1)

|              |      |            |            |            |            |            |      |
|--------------|------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
|              |      | 1210       | 1220       | 1230       | 1240       | 1250       |      |
| circopormank | 1201 | CCATTTCAT  | CTTTTGTC   | GGTCAAGT   | GGGCTGAA   | GTACCTGGAG | 1250 |
| circopormeeh | 1201 | CCAAATCAAT | CTTTGGTTC  | GGTCAAGT   | GGGCTGAA   | GTACCTGGAT | 1250 |
| circopordfp  | 1201 | CCAAATCAAT | CTTTGGTTC  | GGTCAAGT   | GGGCTGAA   | GTACCTGGAG | 1250 |
|              |      | 1260       | 1270       | 1280       | 1290       | 1300       |      |
| circopormank | 1251 | GGTAGGCTAA | GGGGCTGGG  | TATGGCTGG  | GGGAGGAG   | AGTTAAATA  | 1300 |
| circopormeeh | 1251 | GGTAGGCTAA | GGGGCTGGG  | TATGGCTGG  | GGGAGGAG   | AGTTAAATA  | 1300 |
| circopordfp  | 1251 | GGTAGGCTAA | GGGGCTGGG  | TATGGCTGG  | GGGAGGAG   | AGTTAAATA  | 1300 |
|              |      | 1310       | 1320       | 1330       | 1340       | 1350       |      |
| circopormank | 1301 | GGGTCTATAG | GGCAATTTGG | GGAGGGGCT  | TACAACTTTC | GCATCCAAAG | 1350 |
| circopormeeh | 1301 | GGGTCTATAG | GGCAATTTGG | GGAGGGGCT  | TACAACTTTC | GCATCCAAAG | 1350 |
| circopordfp  | 1301 | GGGTCTATAG | GGCAATTTGG | GGAGGGGCT  | TACAACTTTC | GCATCCAAAG | 1350 |
|              |      | 1360       | 1370       | 1380       | 1390       | 1400       |      |
| circopormank | 1351 | TACAACTAG  | GGAGCTAGG  | GGGTCTTTC  | TAGAGCTGAT | GGGTCTCTTG | 1400 |
| circopormeeh | 1351 | TACAACTAG  | GGAGCTAGG  | GGGTCTTTC  | TAGAGCTGAT | GGGTCTCTTG | 1400 |
| circopordfp  | 1351 | TACAACTAG  | GGAGCTAGG  | GGGTCTTTC  | TAGAGCTGAT | GGGTCTCTTG | 1400 |
|              |      | 1410       | 1420       | 1430       | 1440       | 1450       |      |
| circopormank | 1401 | GGTAAATATT | TATATTAGG  | GGTCTAATA  | GGTACGATT  | GGAAAGCTAG | 1450 |
| circopormeeh | 1401 | GGTAAATATT | TATATTAGG  | GGTCTAATA  | GGTACGATT  | GGAAAGCTAG | 1450 |
| circopordfp  | 1401 | GGTAAATATT | TATATTAGG  | GGTCTAATA  | GGTACGATT  | GGAAAGCTAG | 1450 |
|              |      | 1460       | 1470       | 1480       | 1490       | 1500       |      |
| circopormank | 1451 | GGTAGGCGG  | TTGGTCCCG  | TTGGGGGCG  | TGGAACTTC  | GGATCTTGA  | 1500 |
| circopormeeh | 1451 | GGTAGGCGG  | TTGGTCCCG  | TTGGGGGCG  | TGGAACTTC  | GGATCTTGA  | 1500 |
| circopordfp  | 1451 | GGTAGGCGG  | TTGGTCCCG  | TTGGGGGCG  | TGGAACTTC  | GGATCTTGA  | 1500 |
|              |      | 1510       | 1520       | 1530       | 1540       | 1550       |      |
| circopormank | 1501 | TTGTGAAGTG | TTTAAGATTG | TAGATGAGCT | GGAGATGTC  | TCCTTTATTC | 1550 |
| circopormeeh | 1501 | TTGTGAAGTG | TTTAAGATTG | TAGATGAGCT | GGAGATGTC  | TCCTTTATTC | 1550 |
| circopordfp  | 1501 | TTGTGAAGTG | TTTAAGATTG | TAGATGAGCT | GGAGATGTC  | TCCTTTATTC | 1550 |
|              |      | 1560       | 1570       | 1580       | 1590       | 1600       |      |
| circopormank | 1551 | GTGATACAA  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | GGTCTTTC   | 1600 |
| circopormeeh | 1551 | GTGATACAA  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | GGTCTTTC   | 1600 |
| circopordfp  | 1551 | GTGATACAA  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | GGTCTTTC   | 1600 |
|              |      | 1610       | 1620       | 1630       | 1640       | 1650       |      |
| circopormank | 1601 | GGGCACTTC  | TACGGTTTC  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TATGCTTTC  | 1650 |
| circopormeeh | 1601 | GGGCACTTC  | TACGGTTTC  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TATGCTTTC  | 1650 |
| circopordfp  | 1601 | GGGCACTTC  | TACGGTTTC  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TATGCTTTC  | 1650 |
|              |      | 1660       | 1670       | 1680       | 1690       | 1700       |      |
| circopormank | 1651 | GGGCACTTC  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | 1700 |
| circopormeeh | 1651 | GGGCACTTC  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | 1700 |
| circopordfp  | 1651 | GGGCACTTC  | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | TTTCTAGG   | 1700 |
|              |      | 1710       | 1720       | 1730       | 1740       | 1750       |      |
| circopormank | 1701 | TAGGGCTTC  | TTTCTAGG   | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | 1750 |
| circopormeeh | 1701 | TAGGGCTTC  | TTTCTAGG   | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | 1750 |
| circopordfp  | 1701 | TAGGGCTTC  | TTTCTAGG   | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | 1750 |
|              |      | 1760       | 1770       | 1780       | 1790       | 1800       |      |
| circopormank | 1751 | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | 1800 |
| circopormeeh | 1751 | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | 1800 |
| circopordfp  | 1751 | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | TATGCTTTC  | 1800 |

FIGURA 3 (Continuação 2)

|              |     |            |            |            |            |            |     |
|--------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
|              |     | 10         | 20         | 30         | 40         | 50         |     |
| circopormank | 1   | IPSKKSGPOP | IKRVETLNN  | SSLEKNNKTR | SPISLELDY  | TEGEGLLEEG | 50  |
| circopormeeh | 1   | IPSKKSGPOP | IKRVETLNN  | SSLEKNNKTR | SPISLELDYF | TEGEGLLEEG | 50  |
| circopordfp[ | 1   | IPSKKSGPOP | IKRVETLNN  | SSLEKNNKTR | SPISLELDYF | TEGEGLLEEG | 50  |
|              |     | 60         | 70         | 80         | 90         | 100        |     |
| circopormank | 51  | STPHLOGFA  | AKKOTFNK   | NYEGARCIT  | PAKSTDOON  | EYCSKEGII  | 100 |
| circopormeeh | 51  | STPHLOGFA  | AKKOTFNK   | NYEGARCIT  | PAKSTDOON  | EYCSKEGII  | 100 |
| circopordfp[ | 51  | STPHLOGFA  | AKKOTFNK   | NYEGARCIT  | PAKSTDOON  | EYCSKEGII  | 100 |
|              |     | 110        | 120        | 130        | 140        | 150        |     |
| circopormank | 101 | TECGAPRND  | SKRSDLSTAV | STLETGSLV  | TVACFPYTY  | VRNFRGLAEI | 150 |
| circopormeeh | 101 | TECGAPRND  | SKRSDLSTAV | STLETGSLV  | TVACFPYTY  | VRNFRGLAEI | 150 |
| circopordfp[ | 101 | TECGAPRND  | SKRSDLSTAV | STLETGSLV  | TVACFPYTY  | VRNFRGLAEI | 150 |
|              |     | 160        | 170        | 180        | 190        | 200        |     |
| circopormank | 151 | KVSGKMDOR  | QNRFAVHVAV | SPKCGKSGW  | ARNFABPOT  | WKPSPHKKW  | 200 |
| circopormeeh | 151 | KVSGKMDOR  | QNRFAVHVAV | SPKCGKSGW  | ARNFABPOT  | WKPSPHKKW  | 200 |
| circopordfp[ | 151 | KVSGKMDOR  | QNRFAVHVAV | SPKCGKSGW  | ARNFABPOT  | WKPSPHKKW  | 200 |
|              |     | 210        | 220        | 230        | 240        | 250        |     |
| circopormank | 201 | DGYHGEVYV  | DDFYGNLPI  | DDLRLCDRY  | PLTVETKGGT | VPFLARSTLI | 250 |
| circopormeeh | 201 | DGYHGEVYV  | DDFYGNLPI  | DDLRLCDRY  | PLTVETKGGT | VPFLARSTLI | 250 |
| circopordfp[ | 201 | DGYHGEVYV  | DDFYGNLPI  | DDLRLCDRY  | PLTVETKGGT | VPFLARSTLI | 250 |
|              |     | 260        | 270        | 280        | 290        | 300        |     |
| circopormank | 251 | TSNDAPQENY | STAVPAVEA  | YRRTITLOF  | NNTAGEOSTE | VPGRFEAVD  | 300 |
| circopormeeh | 251 | TSNDAPQENY | STAVPAVEA  | YRRTITLOF  | NNTAGEOSTE | VPGRFEAVD  | 300 |
| circopordfp[ | 251 | TSNDAPQENY | STAVPAVEA  | YRRTITLOF  | NNTAGEOSTE | VPGRFEAVD  | 300 |
|              |     | 310        | 320        | 330        | 340        | 350        |     |
| circopormank | 301 | PPCALFPYGI | NY         | .....      | .....      | .....      | 350 |
| circopormeeh | 301 | PPCALFPYGI | NY         | .....      | .....      | .....      | 350 |
| circopordfp[ | 301 | PPCALFPYGI | NY         | .....      | .....      | .....      | 350 |

FIGURA 4

|              |     |            |            |            |            |           |     |
|--------------|-----|------------|------------|------------|------------|-----------|-----|
|              |     | 10         | 20         | 30         | 40         | 50        |     |
| circopormank | 1   | MTNDPRRPR  | RTTRPRSHL  | LERRRPYLA  | HPAFRRRYRW | AKTGTGNSR | 50  |
| circopormeeh | 1   | MTNDPRRPR  | RTTRPRSHL  | LERRRPYLA  | HPAFRRRYRW | AKTGTGNSR | 50  |
| circopordfp[ | 1   | MTNDPRRPR  | RTTRPRSHL  | LERRRPYLV  | HPAFRRRYRW | AKTGTGNSR | 50  |
|              |     | 60         | 70         | 80         | 90         | 100       |     |
| circopormank | 51  | STREVLITR  | IGTSQPSWNV | VEHFNIGQI  | PPSGGTNP   | PLPFQYRTR | 100 |
| circopormeeh | 51  | STREVLITR  | IGTSQPSWNV | VEHFNIGQI  | PPSGGTNP   | PLPFQYRTR | 100 |
| circopordfp[ | 51  | STREVLITR  | IGTSQPSWNV | VEHFNIGQI  | PPSGGTNP   | PLPFQYRTR | 100 |
|              |     | 110        | 120        | 130        | 140        | 150       |     |
| circopormank | 101 | AKYEFYPRD  | PITSNORQYA | STVILDAKE  | VTPTNLAYD  | TYINYSRRH | 150 |
| circopormeeh | 101 | AKYEFYPRD  | PITSNORQYA | STVILDAKE  | VTPTNLAYD  | TYINYSRRH | 150 |
| circopordfp[ | 101 | AKYEFYPRD  | PITSNORQYA | STVILDAKE  | VTPTNLAYD  | TYINYSRRH | 150 |
|              |     | 160        | 170        | 180        | 190        | 200       |     |
| circopormank | 151 | TROPFTYNSR | YETPKPELDO | EDWHPNNK   | RQQLWLEHHC | THVEITGLG | 200 |
| circopormeeh | 151 | TROPFTYNSR | YETPKPELDO | EDWHPNNK   | RQQLWLEHHC | THVEITGLG | 200 |
| circopordfp[ | 151 | TROPFTYNSR | YETPKPELDO | EDWHPNNK   | RQQLWLEHHC | THVEITGLG | 200 |
|              |     | 210        | 220        | 230        | 240        | 250       |     |
| circopormank | 201 | ALQNAATAQ  | IVVRLTIIY  | PFREFILKDP | LNK        | .....     | 250 |
| circopormeeh | 201 | ALQNAATAQ  | IVVRLTIIY  | PFREFILKDP | LNK        | .....     | 250 |
| circopordfp[ | 201 | ALQNAATAQ  | IVVRLTIIY  | PFREFILKDP | LNK        | .....     | 250 |

FIGURA 5

|              |     |            |           |           |           |            |     |
|--------------|-----|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----|
|              |     | 10         | 20        | 30        | 40        | 50         |     |
| circopormank | 1   | ESYPPRLST  | RDVGVPLGS | ETGFLALPT | EGAHYDAYS | LPITLHSH   | 50  |
| circopormeeh | 1   | ESYPPRLST  | RDVGVPLGS | ETGFLALPT | EGAHYDAYS | LPITLHSH   | 50  |
| circopordfp[ | 1   | ESYPPRLST  | RDVGVPLGS | ETGFLALPT | EGAHYDAYS | LPITLHSH   | 50  |
|              |     | 60         | 70        | 80        | 90        | 100        |     |
| circopormank | 51  | GHOKFSQPA  | EGHTRYREL | GYSHORPRE | NGTHSSKQV | AALPLVPRS  | 100 |
| circopormeeh | 51  | GHOKFSQPA  | EGHTRYREL | GYSHORPRE | NGTHSSKQV | AALPLVPRS  | 100 |
| circopordfp[ | 51  | GHOKFSQPA  | EGHTRYREL | GYSHORPRE | NGTHSSKQV | AALPLVPRS  | 100 |
|              |     | 110        | 120       | 130       | 140       | 150        |     |
| circopormank | 101 | ELDKYVAFT  | AVFELLVGS | RRDVAAGT  | PLHLVKS   | LSKTRKPE   | 150 |
| circopormeeh | 101 | ELDKYVAFT  | AVFELLVGS | RRDVAAGT  | PLHLVKS   | LSKTRKPE   | 150 |
| circopordfp[ | 101 | ELDKYVAFT  | AVFELLVGS | RRDVAAGT  | PLHLVKS   | LSKTRKPE   | 150 |
|              |     | 160        | 170       | 180       | 190       | 200        |     |
| circopormank | 151 | VRSTLQTF   | SANKGLKKG | QMKLPYVEL | LGRIKGEH  | PPLMGLRAAF | 200 |
| circopormeeh | 151 | VRSTLQTF   | SANKGLKKG | QMKLPYVEL | LGRIKGEH  | PPLMGLRAAF | 200 |
| circopordfp[ | 151 | VRSTLQTF   | SANKGLKKG | QMKLPYVEL | LGRIKGEH  | PPLMGLRAAF | 200 |
|              |     | 210        | 220       | 230       | 240       | 250        |     |
| circopormank | 201 | AVHFE      | .....     | .....     | .....     | .....      | 250 |
| circopormeeh | 201 | AVHFE-H... | .....     | .....     | .....     | .....      | 250 |
| circopordfp[ | 201 | AVHFE      | .....     | .....     | .....     | .....      | 250 |

FIGURA 6

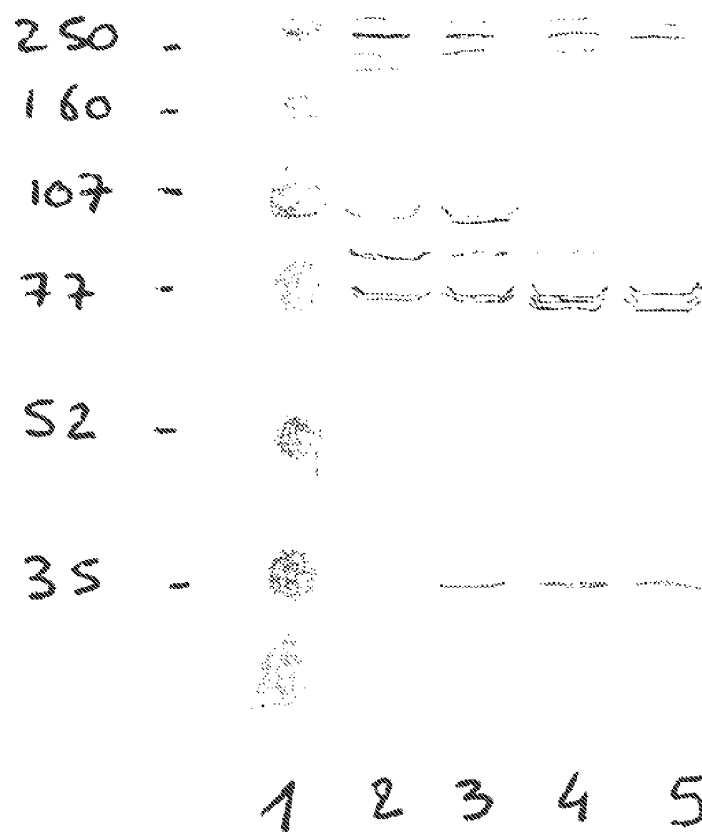


FIGURA 7

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Val Glu Ala Ala Val His Gly  
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Cys Arg Leu Leu Leu Met Gly  
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Gly \*\*\* Cys Cys Cys Ala  
 ---  
 3' TGG TGG CGT GAA GGC GTC GCG GTC GAG CCG TGG TGG AGT CCG CCG TCT ACG  
           9          18          27          36          45          54  
 5' ACC AGC GCA CTT CCG CAG CCG CAG CAC CTC GCC AGC ACC TCA GCA GCA ACA TGC  
 ---  
 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Thr Ser Ala Ala Thr Cys  
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Pro Gln Gln Gln His Ala  
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln His Leu Ser Ser Asn Met Pro  
 ---  
 Ala Leu Leu Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Gly Met Phe Pro Pro His Glu Ser  
 Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Pro Gly Trp Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val  
 Trp Cys Ser Ser His Phe Phe Arg Val Gly Val Gly Tyr Phe Thr Pro Thr \*\*\*  
 ---  
 GGT CGT TCT TCT TAC CTT CTT CGC CTG GGG TGG GGG TAT TTT CCA CCC ACA AGT  
           63          72          81          90          99          108  
 CCA GCA AGA AGA ATG GAA GAA GCG GAC CCC AAC CCC ATA AAA CCG CCG TGT TCA  
 ---  
 Pro Ala Arg Arg Met Glu Glu Ala Asp Pro Asn Pro Ile Lys Gly Gly Cys Ser  
 Gln Gln Glu Glu Trp Lys Lys Arg Thr Pro Thr Pro \*\*\* Lys Val Gly Val His  
 Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr  
 ---  
 Gln Ile Ile Arg Gly Phe Val Leu Ala Leu Phe Tyr Pro Ile Lys Trp Tyr Gly  
 Arg Phe Leu Gly Glu Ser Ser Ser Arg Leu Phe Ile Arg Ser Arg Gly Ile Asp  
 Glu Ser Tyr Asp Lys Arg Leu Arg Ala Cys Ser Phe Val Pro Asp Glu Leu Ile  
 ---  
 GAG AAT TAT TAG GAA GGC TTC TGC TGG CGT TCT TCT ATG CCC TAG AAG GTT ATA  
           117          126          135          144          153          162  
 CTC TGA ATA ATC CTT CCG AAG AGC GGA AGA AAA TAC GCG ATC TTC CAA TAT  
 ---  
 Leu \*\*\* Ile Ile Leu Pro Lys Thr Ser Ala Arg Lys Tyr Gly Ile Phe Gln Tyr  
 Ser Glu \*\*\* Ser Phe Arg Arg Arg Ala Gln Glu Asn Thr Gly Ser Ser Asn Ile  
 Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile Arg Asp Leu Pro Ile Ser  
 ---  
 \*\*\* Lys Ile Ile Lys Asn Asn Ala Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Ser Cys Arg  
 Arg Asn Ser \*\*\* Lys Ile Thr Pro Ser Ser Pro Leu Ser Ser Pro Arg Val Gly  
 Gly Ile Gln Asn Asn \*\*\* Gln Gln Arg Pro Pro Tyr His Pro Leu Val Phe Val  
 ---  
 GGG ATA AAC TAA TAA AAT AAC AAC CGC TCC TCC CAT TAC TCC TTC CTG CTT GTG  
           171          180          189          198          207          216  
 CCC TAT TTG ATT ATT TTA TTG TTG CCG AGG AAG GTA ATG AGG AAG GAC GAA CAC  
 ---  
 Pro Tyr Leu Ile Ile Leu Leu Leu Ala Arg Arg Val Met Arg Lys Asp Glu His  
 Pro Ile \*\*\* Leu Phe Tyr Cys Trp Arg Gly Gly \*\*\* \*\*\* Gly Arg Thr Asn Thr  
 Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro  
 ---  
 Val Glu Leu Pro Glu Ser Ile Lys His Leu Leu Leu Ser Lys Ile Phe His Leu  
 \*\*\* Arg Trp Pro Asn Ala Leu Lys Thr Phe Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe  
 Glu Gly Gly Pro Thr Arg \*\*\* Asn Gln Ser Ser Ala Ser Lys \*\*\* Tyr Leu Ser  
 ---  
 GAG TGG AGG TCC CCA AGC GAT TAA AAC ACT TCT TCG TCT GAA AAT TAT TTC ACT  
           225          234          243          252          261          270  
 CTC ACC TCC AGG GGT TCG CTA ATT TTG TGA AGA AGC AGA CTT TTA ATA AAG TGA  
 ---  
 Leu Thr Ser Arg Gly Ser Leu Ile Leu \*\*\* Arg Ser Arg Leu Leu Ile Lys \*\*\*  
 Ser Pro Pro Gly Val Arg \*\*\* Phe Cys Glu Glu Ala Asp Phe \*\*\* \*\*\* Ser Glu  
 His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys

FIGURA 8



Pro Ile Gln Thr Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Cys Ile Leu Leu  
 His Tyr Lys Pro Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser \*\*\* Cys  
 Thr Thr Asn Pro His Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Leu Asp Ala  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TCA CCA TAA ACC CAC GGG CGA CCG TGT ACC TCT TTC CCT TTC CTT CTC TAG TCG  
 279 288 297 306 315 324  
 AGT GGT ATT TGG GTG CCC GCT GCC ACA TCG AGA AAG CGA AAG GAA CAG ATC ACC  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Ser Gly Ile Trp Val Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Gln Ile Ser  
 Val Val Phe Gly Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Ser Ala  
 Trp Tyr Leu Gly Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln

Ile Phe Phe Val Ala Thr Phe Phe Ala Val \*\*\* Gln His Leu Thr Ser Ser Arg  
 Phe Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Ser Pro Leu Lys Ser Ile Ser His Pro Ala Gly  
 Ser Tyr Leu Ile Ser Cys Tyr Leu Leu Cys Ser Val Ser Pro Thr His Leu Glu  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TCT TAT TTC TTA TGA CGT CAT TTC CCG TGA ATG ACT ACC TCA CAC CTC GAG  
 333 342 351 360 369 378  
 AGA ATA AAG AAT ACT CCA GTA AAG AAG CCA ACT TAC TGA TGG ACT GTG GAG CTC  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Arg Ile Lys Asn Thr Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr \*\*\* Trp Ser Val Glu Leu  
 Glu \*\*\* Arg Ile Leu Gln \*\*\* Arg Arg Gln Leu Thr Asp Gly Val Trp Ser Ser  
 Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met Glu Cys Gly Ala Pro

Ser Arg Leu Ser Leu Pro Thr Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Gln Gln Leu  
 Leu Asp \*\*\* Pro Cys Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Lys Asn Ser  
 \*\*\* Ile Glu Pro Val Val Ser His Gly Thr \*\*\* Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GAT CTA GAG TCC CTG TTG CCT CAC TGG ACA GAT GAC GAC ACT CAT GGA ACA ACC  
 387 396 405 414 423 432  
 CTA GAT CTC AGG GAC AAC GGA GTG ACC TGT CTA CTG CTG TGA GTA CCT TGT TGG  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Leu Asp Leu Arg Asp Asn Gly Val Thr Cys Leu Leu Leu \*\*\* Val Pro Cys Trp  
 \*\*\* Ile Ser Gly Thr Thr Glu \*\*\* Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Leu Val Gly  
 Arg Ser Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu

Ala Pro Thr Gln His Gly Asn Cys Leu Leu Val Arg Tyr Arg Lys Asp Ser Ile  
 Leu Pro Leu Arg Thr Val Thr Ala Ser Cys Cys Gly Thr Val Asn Thr Leu Phe  
 Ser Arg Ser Asp Pro Ser Arg Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Thr Gln \*\*\* Phe  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TCT CGC CCT CAG ACC ACT GGC AAC GTC TCG TCG TGG GAC ATT GCA AAC AGT CTT  
 441 450 459 468 477 486  
 AGA GCG GGA GTC TGG TGA CCG TTG CAG AGC ACC ACC CTG TAA CGT TTG TCA GAA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Arg Ala Gly Val Trp \*\*\* Pro Leu Gln Ser Ser Thr Leu \*\*\* Arg Leu Ser Glu  
 Glu Arg Glu Ser Gly Asp Arg Cys Arg Ala Ala Pro Cys Asn Val Cys Gln Lys  
 Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val Arg Asn

Glu Ala Pro Gln Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Phe His Leu Leu Thr Ile  
 Lys Arg Pro Ser Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Phe Arg Ser  
 Asn Gly Arg Ala Pro Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Phe Ala Ser Ala His  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TAA AGG CGC CCG ACC GAC TTG AAA ACT TTC ACT CGC CCT TTT ACG TCT TCG CAC  
 495 504 513 522 531 540  
 ATT TCC CCG GGC TGG CTG AAC TTT TGA AAG TGA CCG GGA AAA TGC AGA AGC GTG  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Ile Ser Ala Gly Trp Leu Asn Phe \*\*\* Lys \*\*\* Ala Gly Lys Cys Arg Ser Val  
 Phe Pro Arg Ala Gly \*\*\* Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asn Ala Glu Ala \*\*\*  
 Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Lys Arg Asp

FIGURA 8 (Continuação 1)

Pro Leu Ser Ile Tyr Val Asp Asn His Pro Trp Arg Pro Thr Thr Phe Ala Phe  
 Gln Phe Val Leu Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro His Pro Leu Leu Leu  
 Asn Ser Ser \*\*\* His Val Arg \*\*\* Gln Pro Ala Val Gln Thr His Tyr Phe Cys  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TAA CCT TCT GAT TAC ATG TCC AGT AAC ACC CCG GTG GAC CCA CAC CAT TTT CGT  
 549 558 567 576 585 594  
 ATT GGA AGA CTA ATG TAC ACG TCA TTG TGG CCC CAC CTG GGT GTG GTA AAA CCA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Ile Gly Arg Leu Met Tyr Thr Ser Leu Trp Gly His Leu Gly Val Val Lys Ala  
 Leu Glu Asp \*\*\* Cys Thr Arg His Cys Gly Ala Thr Trp Val Trp \*\*\* Lys Gln  
 Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Lys

Pro Ser Ser Ile Lys Cys Val Arg Phe Gly Cys Val Pro Phe Trp Arg Ser Val  
 His Ala Ala Leu Lys Ala Ser Gly Ser Val Val Tyr Gln Phe Gly Gly Leu Phe  
 Ile Pro Gln \*\*\* Asn Gln Leu Gly Pro Phe Trp Met Ser Ser Val Val \*\*\* Phe  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TTA CCC GAC CAT TAA AAC GTC TCG GCC TTT GGT GTA TGA CCT TTG GTG GAT CTT  
 603 612 621 630 639 648  
 AAT GGG CTG CTA ATT TTG CAG ACC CGG AAA CCA CAT ACT GGA AAC CAC CTA GAA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Asn Gly Leu Leu Ile Leu Gln Thr Arg Lys Pro His Thr Gly Asn His Leu Glu  
 Met Gly Cys \*\*\* Phe Cys Arg Pro Gly Asn His Ile Leu Glu Thr Thr \*\*\* Lys  
 Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn

Leu Pro Pro Ile Thr Val Met Thr Phe Phe His Asn Asn Asn Ile Val Lys Ile  
 Leu His His Ser Pro \*\*\* Trp Pro Ser Ser Thr Thr Thr Ile Ser Ser Lys \*\*\*  
 Cys Thr Thr Pro His Asn Gly His His Leu Leu Pro Gln \*\*\* Gln His Ser Lys  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TGT TCA CCA CCC TAC CAA TGG TAC CAC TTC TTC ACC AAC AAT AAC TAC TGA AAA  
 657 666 675 684 693 702  
 ACA AGT GGT GGG ATG GGT ACC ATG GTG AAG AAG TGG TTG TTA TTG ATG ACT TTT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Thr Ser Gly Gly Met Val Thr Met Val Lys Lys Trp Leu Leu Met Thr Phe  
 Gln Val Val Gly Trp Leu Pro Trp \*\*\* Arg Ser Gly Cys Tyr \*\*\* \*\*\* Leu Leu  
 Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr

Ala Pro Gln Gly Pro Ile Ile \*\*\* Gln Ser Gln Thr Ile Ser Ile Trp Gln Ser  
 Pro Gln Ser Gly Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val  
 His Ser Ala Ala Arg Pro His Asp Val Ser Val Thr His Asp Ile Asp Met Ser  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TAC CGA CCG ACG GGA CCC TAC TAG ATG ACT CTG ACA CAC TAG CTA TAG GTA ACT  
 711 720 729 738 747 756  
 ATG CCT GGC TGC CCT GCG ATG ATC TAC TGA GAC TGT GTG ATC GAT ATC CAT TGA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Met Ala Gly Cys Pro Gly Met Ile Tyr \*\*\* Asp Cys Val Ile Asp Ile His \*\*\*  
 Trp Leu Ala Ala Leu Gly \*\*\* Ser Thr Glu Thr Val \*\*\* Ser Ile Ser Ile Asp  
 Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr

Tyr Leu Ser Phe Thr Ser Ser Tyr Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly  
 Thr Ser Val Leu Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Arg Ile Val  
 Gln Leu Ser \*\*\* Leu His Phe Gln Val Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Glu Ser \*\*\*  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GAC ATC TCT GAT TTC CAC CTT GAC ATG GAA AAA ACC GGG CGT CAT AAG ACT AAT  
 765 774 783 792 801 810  
 CTC TAG AGA CTA AAG GTG GAA CTG TAC CTT TTT TGG CCC GCA GTA TTC TGA TTA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Leu \*\*\* Arg Leu Lys Val Glu Leu Tyr Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe \*\*\* Leu  
 Cys Arg Asp \*\*\* Arg Trp Asn Cys Thr Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Ser Asp Tyr  
 Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr

FIGURA 8 (Continuação 2)

Ala Ile Leu Gly Arg Gln Phe Pro Val Gly \*\*\* Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe  
 Leu Leu \*\*\* Val Gly Asn Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser  
 Trp Cys Asp Ser Gly Thr Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GGT GGT TAG TCT GGG GCA ACC TTA CCA TGA GGA GTT GAC GAC AGG CTC GAC ATC  
 819 828 837 846 855 864  
 CCA GCA ATC AGA CCC CGT TGG AAT GGT ACT CCT CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Pro Ala Ile Arg Pro Arg Trp Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu \*\*\*  
 Gln Gln Ser Asp Pro Val Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg  
 Ser Asn Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu

Ser Lys Ile Pro Pro Asn Ser Gly Gln Tyr Lys Pro Leu Ile Ser Cys Phe Leu  
 Ala Arg \*\*\* Arg Leu Ile Val Glu Lys Thr Asn Gln Phe Phe Ala Val Ser Cys  
 Leu Glu Lys Asp Ser Ser \*\*\* Lys Arg Pro Ile Lys Ser Ser His \*\*\* Leu Val  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TTC GAG AAA TAG CCT CCT AAT GAA ACC ATA AAA CCT TCT TAC GAT GTC TTG  
 873 882 891 900 909 918  
 AAG CTC TTT ATC GGA GGA TTA CTT CCT TGG TAT TTT GGA AGA ATG CTA CAG AAC  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Leu Pro Trp Tyr Phe Gly Arg Met Leu Gln Asn  
 Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Phe Leu Gly Ile Leu Glu Glu Cys Tyr Arg Thr  
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr Glu Gln

Gly Arg Leu Phe Pro Ala Leu Glu Asp Gly Lys Gly Gly Trp Ala Arg Phe Lys  
 Asp Val Ser Ser Pro Pro Trp Asn Thr Val Arg Glu Gly Gly His Gly Ser Asn  
 Ile Trp Pro Pro Leu Pro Gly Thr Arg \*\*\* Gly Lys Gly Gly Met Gly Gln Ile  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TTA GGT GCC TCC TTC CCC CGG TCA AGC AGT GGG AAA GGG GGG GTA CGG GAC TTA  
 927 936 945 954 963 972  
 AAT CCA CGG AGG AAG GGG GCC AGT TCG TCA CCC TTT CCC CCC CAT GCC CTG AAT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Asn Pro Arg Arg Lys Gly Ala Ser Ser Ser Pro Phe Pro Pro His Ala Leu Asn  
 Ile His Gly Gly Arg Gly Pro Val Arg His Pro Phe Pro Pro Met Pro \*\*\* Ile  
 Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro Cys Pro Glu Phe

Trp Ile Phe Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asp Ser Arg Leu Pro Lys \*\*\* \*\*\*  
 Gly Tyr Ser Ile Phe \*\*\* Gln Thr Lys Lys Ile Val Glu Tyr His Asn Lys Asn  
 Glu Met His Phe Leu Asn Ser Leu Arg Lys \*\*\* \*\*\* Lys Thr Ile Thr Lys Ile  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 AAG GTA TAC TTT ATT TAA TGA CTC AGA AAA AAT AGT GAA GCA TTA CCA AAA ATA  
 981 990 999 1008 1017 1026  
 TTC CAT ATG AAA TAA ATT ACT GAG TCT TTT TTA TCA CTT CGT AAT CGT TTT TAT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Phe His Met Lys \*\*\* Ile Thr Glu Ser Phe Leu Ser Leu Arg Asn Gly Phe Tyr  
 Ser Ile \*\*\* Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Tyr His Phe Val Met Val Phe Ile  
 Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr \*\*\* Val Phe Phe Ile Thr Ser \*\*\* Trp Phe Leu Leu

Glu Asn Leu Thr Leu His Pro Thr Lys Leu Ile Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met  
 Asn Met Leu Pro \*\*\* Thr Pro Pro Arg \*\*\* Phe \*\*\* Ile Arg Gln Ile Thr Cys  
 Ile \*\*\* \*\*\* Pro Asn Leu Pro Pro Asp Lys Phe Asn Phe Glu Arg Phe Gln Val  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 ATA AGT AAT TCC CAA TTC ACC CCC CAG AAA TTT TAA TTT AAG AGA CTT AAC ATG  
 1035 1044 1053 1062 1071 1080  
 TAT TCA TTA AGG GTT AAG TGG GGG GTC TTT AAA AIT AAA TTC TCT GAA TTG TAC  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Tyr Ser Leu Arg Val Lys Trp Gly Val Phe Lys Ile Lys Phe Ser Glu Leu Tyr  
 Ile His \*\*\* Gly Leu Ser Gly Gly Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Asn Cys Thr  
 Phe Ile Lys Gly \*\*\* Val Gly Gly Leu \*\*\* Asn \*\*\* Ile Leu \*\*\* Ile Val His

FIGURA 8 (Continuação 3)

Cys Pro \*\*\* Val Ser Ile Thr Asn Arg Thr Thr Tyr Val Thr Lys Ser Arg Leu  
 Val His Asn Cys Pro Tyr Gln Ile Gly Pro Arg Ile Tyr Gln Lys Arg Val Cys  
 Tyr Met Thr Val Arg Ile Asn Tyr Glu Gln Asp Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Ala  
 ---  
 TAT GTA CCA ATG TGC CTA TAA CAT AAG GAC CAG CAT ATA TGA CAA AAG CTT GCG  
 1099 1098 1107 1116 1125 1134  
 ATA CAT GGT TAC ACG GAT ATT GTA TTC CTG GTC GTA TAT ACT GAT TTC GAA CCG  
 ---  
 Ile His Gly Tyr Thr Asp Ile Val Phe Leu Val Val Tyr Thr Val Phe Glu Arg  
 Tyr Met Val Thr Arg Ile Leu Tyr Ser Trp Ser Tyr Ile Leu Phe Ser Asn Ala  
 Thr Trp Leu His Gly Tyr Cys Ile Pro Gly Arg Ile Tyr Cys Phe Arg Thr Gln

Ala Ser Ala \*\*\* Thr Thr \*\*\* Met Glu Leu Leu Lys Tyr Asp \*\*\* Gly Cys Ser  
 His Arg Pro Arg Arg Pro Arg Cys Lys Trp Cys Asn Thr Thr Glu Ala Val Ala  
 Thr Gly Leu Gly Val His Asp Val Asn Gly Ala Thr Gln Leu Arg Leu Trp Leu  
 ---  
 TCA CCG CTC CCG ATG CAC CAG ATG TAA AGG TCG TCA AAC ATC AGA GTC GGT GTC  
 1143 1152 1161 1170 1179 1188  
 AGT GCC GAG GCC TAC GTG CTC TAC ATT TCC AGC AGT TTC TAG TCT CAG CCA CAG  
 ---  
 Ser Ala Glu Ala Tyr Val Val Tyr Ile Ser Ser Ser Leu \*\*\* Ser Gln Pro Gln  
 Val Pro Arg Pro Thr Trp Ser Thr Phe Pro Ala Val Cys Ser Leu Ser His Ser  
 Cys Arg Gly Leu Arg Gly Leu His Phe Gln Gln Phe Val Val Ser Ala Thr Ala

Thr Glu Lys Thr Thr Gln Asn Ser Thr Ile Leu Leu Ser Ile \*\*\* Ser Leu Asn  
 Pro Lys Lys Gln Gln Lys Thr Pro Leu Leu \*\*\* Tyr His Phe Arg Pro Cys Thr  
 Gln Asn Arg Lys Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Asp Ile Thr Phe Asp Leu Val Pro  
 ---  
 GAC CAA AGA AAA CAA CAA ACC AAC CTT CAT TAG TTA TCA CTT TAG ATC CTC TCC  
 1197 1206 1215 1224 1233 1242  
 CTC GTP TCT TTT CTT GTT TGG TEG GAA GTA ATC AAT AOT GAA ATC TAG GAC AGG  
 ---  
 Leu Val Ser Phe Val Val Trp Leu Glu Val Ile Asn Ser Glu Ile \*\*\* Asp Arg  
 Trp Phe Leu Leu Leu Phe Gly Trp Lys \*\*\* Ser Ile Val Lys Ser Arg Thr Gly  
 Gly Phe Phe Cys Cys Leu Val Gly Ser Asn Gln \*\*\* \*\*\* Asn Leu Gly Gln Val

Pro Pro Leu Thr Gly Pro Thr Thr Pro Ser Pro Ser Pro \*\*\* Pro Ile Ala Pro  
 Gln Pro Tyr Leu Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu Ala Pro Asn His Tyr Pro Pro  
 Lys Pro Thr Phe Tyr Arg Ser His Tyr Ser Phe Pro Gln Thr Ile Thr His Arg  
 ---  
 AAA CCC CCA TTT CAT GGC CCT CAC CAT CCT CTT CCC GAC CCA ATA CCA TAC GGC  
 1251 1260 1269 1278 1287 1296  
 TTT GGG GGT AAA GTA CCG GGA GAG GTA GGA GAA GGG CCG GGT TTT GGT ATG CCG  
 ---  
 Phe Gly Gly Lys Val Pro Gly Val Val Gly Glu Gly Leu Gly Tyr Gly Met Ala  
 Leu Gly Val Lys Tyr Arg Glu Trp \*\*\* Glu Lys Gly Trp Val Met Val Trp Arg  
 Trp Gly \*\*\* Ser Thr Gly Ser Gly Arg Arg Arg Ala Gly Leu Trp Tyr Gly Gly

Pro Thr Thr \*\*\* Met Pro Thr Met Pro Ser Pro Gln Pro Arg Gln \*\*\* Leu Thr  
 Leu Leu Leu Lys Cys Leu Pro \*\*\* Leu His Pro Ser His Gly Lys Asn Cys Leu  
 Ser Ser Tyr Asn Val Tyr Pro Asp Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Lys Thr Val Phe  
 ---  
 CCT CTT CAT CAA ATG TAT CCC CAG TAT CCA CTC CCG ACA CCG GAA ACA ATG TTT  
 1305 1314 1323 1332 1341 1350  
 GGA GGA GTA GTT TAC ATA GGG GTC ATA GGT GAG GGC TGT GGC CTT TGT TAC AAA  
 ---  
 Gly Gly Val Val Tyr Ile Gly Val Ile Gly Glu Gly Cys Gly Leu Cys Tyr Lys  
 Glu Glu \*\*\* Phe Thr \*\*\* Gly Ser \*\*\* Val Arg Ala Val Ala Phe Val Thr Lys  
 Arg Ser Ser Leu His Arg Gly His Arg \*\*\* Gly Leu Trp Pro Leu Leu Gln Ser

FIGURA 8 (continuação 4)

Ile Met \*\*\* Phe Leu Leu Val Pro Ala Trp Glu Gly Thr Val Arg Pro Ser Arg  
 \*\*\* Arg Phe Tyr Cys Cys Gln Leu Gly Ser Gly Gln \*\*\* Gly Pro His Asp  
 Asn Asp Asp Leu Ile Val Ala Ser Ser Gly Val Gly Arg Asp Gly Gln Thr Ile  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 CAA TAG TAG ATT TTA TTG TCG TGA CCT CGG GTG AGG GGA CAG TGG GAC CCA CTA  
 1359 1368 1377 1386 1395 1404  
 GTT ATC ATC TAA AAT AAC AGC ACT GGA GCC CAC TCC CCT GTC ACC CTG GGT GAT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Val Ile Ile \*\*\* Asn Asn Ser Thr Gly Ala His Ser Pro Val Thr Leu Gly Asp  
 Leu Ser Ser Lys Ile Thr Ala Leu Glu Pro Thr Pro Leu Ser Pro Trp Val Ile  
 Tyr His Leu Lys \*\*\* Gln His Trp Ser Pro Leu Pro Cys His Pro Gly \*\*\* Ser

Pro Ala Pro Gly Ser Asn Leu Arg Leu Arg Glu \*\*\* Glu Thr Thr Asn Leu Pro  
 Pro Leu Leu Ala Leu Ile \*\*\* Gly \*\*\* Gly Lys Lys Asn Gln Leu Ile \*\*\* Leu  
 Pro Ser Cys Pro Trp Phe Glu Val Lys Val Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Glu Phe  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GCC CCT CGT CCC GGT CTT AAG TTG GAA TTG GAA ACA ATA ACA CAT CAT AAG TTT  
 1413 1422 1431 1440 1449 1458  
 CGG GGA GCA GGG CCA GAA TTC AAC CTT AAC CTT TCT TAT TCT GTA GTA TTC AAA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Arg Gly Ala Gly Pro Glu Phe Asn Leu Asn Leu Ser Tyr Ser Val Val Phe Lys  
 Gly Glu Gln Gly Gln Asn Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Leu \*\*\* Tyr Ser Lys  
 Gly Ser Arg Ala Arg Ile Gln Pro \*\*\* Pro Phe Leu Phe Cys Ser Ile Gln Arg

Cys Leu Ala Pro Thr Gln Gly Gly Glu Gln Pro Phe Phe Thr Met Leu Ile Ser  
 Ala Cys Leu Pro Pro Lys Val Gly Arg Arg Pro Ser Ser Leu \*\*\* \*\*\* Tyr Gln  
 Pro Val Ser Arg Pro Asn Ser Gly Gly Gly Pro Pro Leu Phe Asp Asn Ile Asn  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 CCC GTG TCT CGC CCC CAA ACT GGG GGG AGG ACC CCC TTC TTT CAG TAA TTA TAA  
 1467 1476 1485 1494 1503 1512  
 GGG CAC AGA GCG GGG GTT TGA CCC CCC TCC TGG GGG AAG AAA GTC ATT AAT ATT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Gly His Arg Ala Gly Val \*\*\* Pro Pro Ser Trp Gly Lys Lys Val Ile Asn Ile  
 Gly Thr Glu Arg Gly Phe Asp Pro Pro Pro Gly Gly Arg Lys Ser Leu Ile Leu  
 Ala Gln Ser Gly Gly Leu Thr Pro Leu Leu Gly Glu Glu Ser His \*\*\* Tyr \*\*\*

Asp \*\*\* \*\*\* Thr Trp Arg Gly Pro Pro Arg Glu Ser Gln Pro Glu Ser Ser Leu  
 Ile Glu Asp His Gly Gly Gly Leu Leu Ala Asn Gln Ser His Asn Ala Gln Cys  
 Phe Arg Met Met Asp Val Ala Trp Ser Pro Thr Arg Val Thr Thr Arg Lys Val  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 CTT AGA GGA GTA CAG GTC GCG GGT CCT CCC GCA AGA CTG ACA CCA AGC GAA CTG  
 1521 1530 1539 1548 1557 1566  
 GAA TCT CAT CAT GTC CAC CGC CCA GGA GGG CGT TCT GAC TGT GGT TGG CTT GAC  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Glu Ser His His Val His Arg Pro Gly Gly Arg Ser Asp Cys Gly Ser Leu Asp  
 Asn Leu Ile Met Ser Thr Ala Gln Glu Gly Val Leu Thr Val Val Arg Leu Thr  
 Ile Ser Ser Cys Pro Pro Pro Arg Arg Ala Phe \*\*\* Leu Trp Phe Ala \*\*\* Gln

Ile Asp Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ala Met Lys Gly Glu Gly  
 Tyr Ile Arg Leu His Pro Leu Pro Pro His Gln Leu His Trp Lys Glu Lys Glu  
 Thr Tyr Gly Phe Thr Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Ile Gly Asn Lys Arg Arg  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 TCA TAT AGC CTT CCA CGC CCT CTC CGC CCA CAA CTT CTA CCG TAA AAA GGA AGA  
 1575 1584 1593 1602 1611 1620  
 AGT ATA TCC GAA GGT GCG GGA GAG GCG GGT GTT GAA GAT GCC AAT TTT CCT TCT  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Ser Ile Ser Glu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Val Glu Asp Ala Ile Phe Pro Ser  
 Val Tyr Pro Lys Val Arg Glu Arg Arg Val Leu Lys Met Pro Phe Phe Leu Leu  
 Tyr Ile Arg Arg Cys Gly Arg Gly Gly Cys \*\*\* Arg Cys His Phe Ser Phe Ser

FIGURA 8 (continuação 5)

Ala Thr Val Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gly Pro Ala Ala Ala Ser Ser Arg Ala  
 Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Pro Pro Pro Pro Asp Pro  
 Trp Arg Tyr Arg His Arg Pro His Val Leu Trp Pro Arg Arg Arg Leu Ile Gln  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GGT CGC CAT TGC CAC CGC CCC CAC CTG CTC GGT CCC CGC CGC CTC CTA GAC  
 1629 1638 1647 1656 1665 1674  
 CCA GCG GTA ACG GTG GCG GGG GTG GAC GAG CCA GCG GCG GCG GTG GAG GAT CTG  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Pro Ala Val Thr Val Ala Gly Val Asp Glu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Asp Leu  
 Gln Arg \*\*\* Arg Trp Arg Gly Trp Thr Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Ile Trp  
 Ser Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
  
 Leu Ile Ala Ala Pro Ala Thr Asp Glu Glu Glu Thr Val Gly Gly Gln Ile Arg  
 Trp Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr Lys Lys Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ser Val  
 Gly Leu His Ser Arg Pro Arg His Arg Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Tyr  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 CCG TTC TAC CCA CGC CCC CGC CAC AGA AGA AGA ACC CAT TGC GGA GGA ACC TAT  
 1683 1692 1701 1710 1719 1728  
 GCC AAG ATG GCT CCG GCG GCG GTG TCT TCT TCT TCG GTA ACC CCT CCT TCG ATA  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Ala Lys Met Ala Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Pro Pro Trp Ile  
 Pro Arg Trp Leu Arg Gly Arg Cys Leu Leu Leu Arg \*\*\* Arg Leu Leu Gly Tyr  
 Gln Asp Gly Cys Gly Gly Gly Val Phe Phe Phe Gly Asn Ala Ser Leu Asp Thr  
  
 \*\*\* Ile Gln Phe Arg Phe Phe His Ala Thr Leu Ile  
 Asp Tyr Arg Phe Val Phe Ser Thr Arg Gln Leu Tyr  
 Thr Met Asp Ser Phe Ser Leu Leu Ala Ser Tyr Thr Asn  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 GCA GTA TAG ACT TTT GCT TTC TTC ACG CGA CAT TCA TAA 5'  
 1737 1746 1755 1764  
 CGT CAT ATC TGA AAA CGA AAG AAG TGC GCT GTA AGT ATT 3'  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 Arg His Ile \*\*\* Lys Arg Lys Lys Cys Ala Val Ser Ile  
 Val Ile Ser Glu Asn Glu Arg Ser Ala Leu \*\*\* Val  
 Ser Tyr Leu Lys Thr Lys Glu Val Arg Cys Lys Tyr

FIGURA 8 (continuação 6)

GMQ em gramas

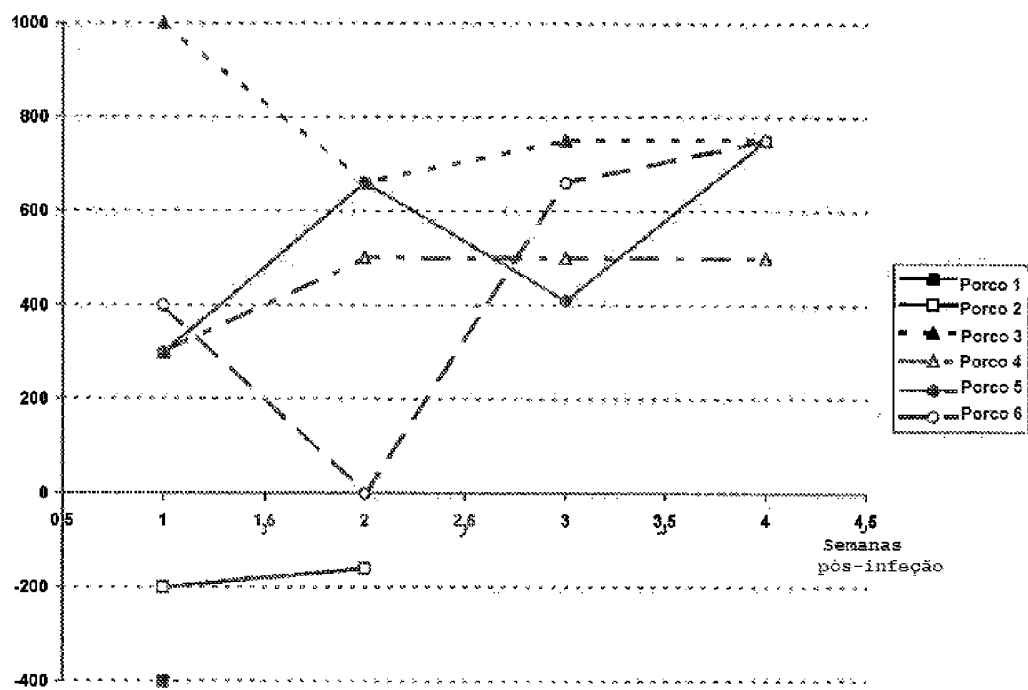


FIGURA 9

gmq : D0 - D28

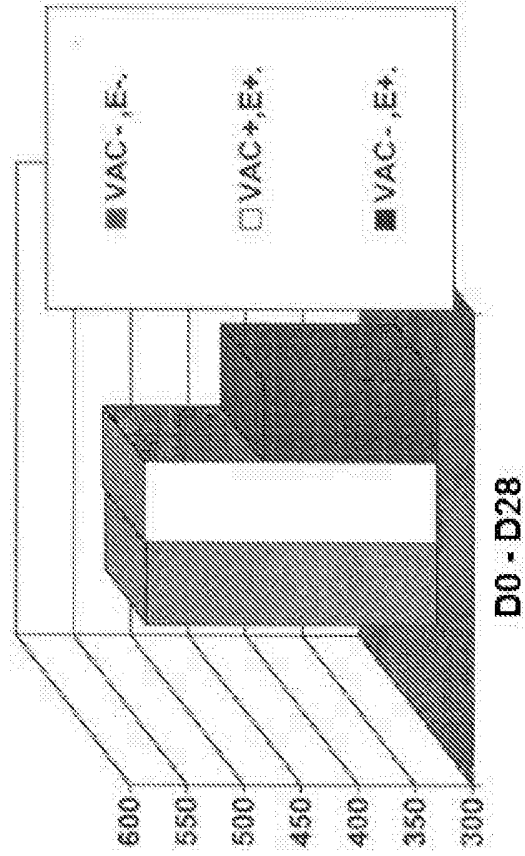


FIGURA 10



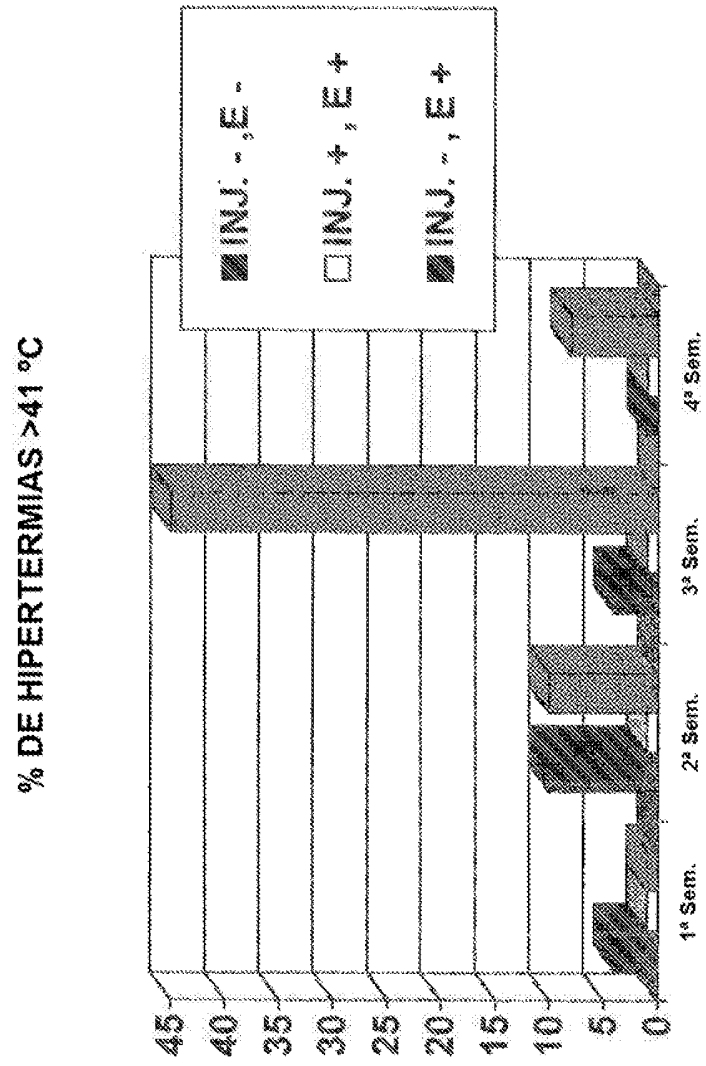


FIGURA 11

Tipo B  
spot n.° 104 a 159

Tipo A  
spot n.° 160 a 215

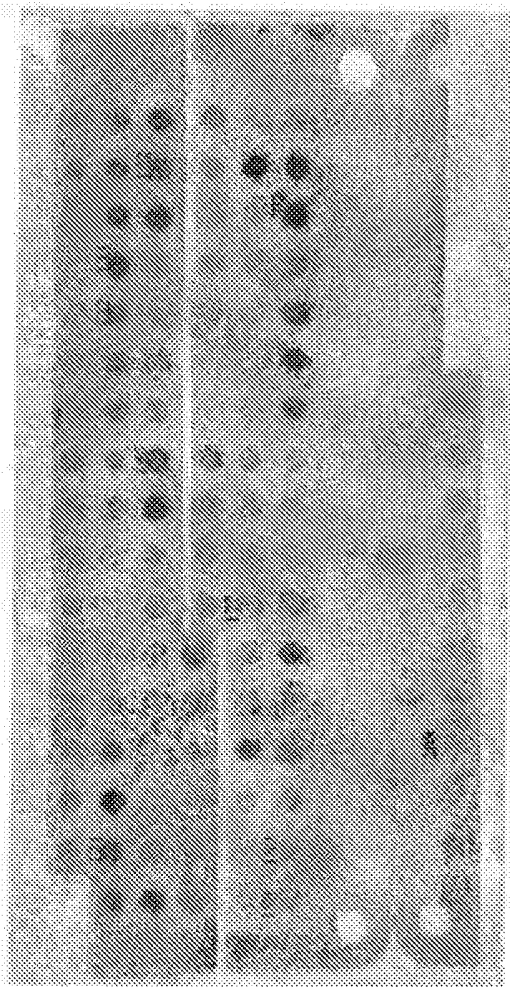


FIGURA 12

1 50 51  
pcvA MTWPRRRYRR RRTRRSRHLG NTLRRRPYLW HEAFRRRYRW RRKTGIFNSR LSRFVLTI. RCHSQPSWN  
pcvB MTYRRRRYRR RHRPRSHLG QILRRRWLV HP..RHYRW RRKNGIENTE LSRIFGYTVK RITVRTPSWA

péptido 177 100 101 péptido 188 a 189  
pcvA VNELRFNIGQ FLPRSGGNE LPLRPQYRI RKAKVEEYER DPITSNQRGV GSTVVILDAN EVTESTNLAY  
pcvB VDEMRENIND FLPRSGGSNE RSVPEEYRI RKVKVEFWEC SPITQGRGV GSSAVILDDN FVTKATALTY

péptido 121 150 151 péptido 132 a 133  
pcvA RPYINYSSEH TIROPFTYHS RYETKPELD QTIDWFQPNN KRNQLMLHLN THINVEHTGL GYALONATTA  
pcvB DEIVNYSSRH TITOFFSYHS RYETZKPLVD FTLDYFQPNN KRNQLMLRLO TACNVDPVGL GTAFENSIYD

235 péptido 152  
pcvA QNYVRLTIY VQREEFILKD P.LNE  
pcvB QEYNIRVTMY VQREFNFKD PELNP

FIGURA 13