



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

(21) **PI0615610-0 A2**

(22) Data de Depósito: 30/08/2006
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68 2006.01

(54) Título: **PROCESSOS E COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO DE ANIMAIS COM ANTÍGENOS DE PRRSV COM MAIOR IMUNOGENICIDADE**

(30) Prioridade Unionista: 30/08/2005 US 60/712,357

(73) Titular(es): BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA

(72) Inventor(es): ASIT K. PATTNAIK, FERNANDO A. OSORIO, ISRARUL H. ANSARI

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006033990 de 30/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/040876 de 12/04/2007

(57) Resumo: PROCESSOS E COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO DE ANIMAIS COM ANTÍGENOS DE PRRSV COM MAIOR IMUNOGENICIDADE. Porcos desafiados com variações hipoglicosiladas da proteína GP5 principal de superfície do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV) exibiram maior produção de anticorpos neutralizadores de PRRSV em relação aos níveis de anticorpos neutralizadores produzidos por porcos imunizados com GP5 do tipo selvagem (wt) ou glicosilada. Esta invenção fornece processos de obtenção de respostas imunológicas maiores em porcos para o PRRSV, composições úteis para a obtenção de respostas imunológicas maiores assim como polinucleotídeos isolados que codificam variações hipoglicosiladas da proteína GP5 principal de superfície de PRRSV.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSOS E COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO DE ANIMAIS COM ANTÍGENOS DE PRRSV COM MAIOR IMUNOGENICIDADE**".

Referência Cruzada aos Pedidos de Patentes Relacionados

5 Este pedido de patente reivindica prioridade ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 60/712.357, depositado em 30 de agosto de 2005.

Citação Em Relação à Pesquisa ou ao Desenvolvimento Patrocinado Federalmente

10 Esta invenção foi feita com o apoio do Governo sob uma Concessão Competitiva de Iniciativa de Pesquisa Nacional #2004-01576 do Departamento U.S. de Agricultura e sob um programa COBRE do Instituto Nacional de Saúde (National Institute of Health) do Centro Nacional para Recursos para Pesquisa Projeto # P20RR15636. O governo possui certos direitos a esta invenção.

15 Apêndice

Não Aplicável

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

20 A presente invenção refere-se de forma geral a composições que compreendem antígenos do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV) com maior imunogenicidade e a métodos para o uso dos mesmos. As composições e os métodos descritos aqui resultam em respostas imunogênicas melhoradas de porcos aos antígenos de PRRSV, fornecendo assim uma maior proteção de porcos à infecção causada pelo PRRSV.

25 Arte Relacionada

30 O PRRSV é um agente patogênico economicamente importante que afeta porcos. A infecção de porcas e leitoas com PRRSV pode resultar em falha reprodutiva. O PRRSV causa ainda doença respiratória em porcos de todas as idades. É possível vacinar os porcos para protegê-los da infecção com PRRSV. Entretanto, as vacinas disponíveis comercialmente atuais (cuja maior parte é constituída de vacinas atenuadas vivas) são de alguma

maneira ineficientes e, portanto, devem ser melhoradas. Os mecanismos imunológicos completos de proteção contra o PRRSV não estão claros; entretanto, foi mostrado claramente que os anticorpos que neutralizam o PRRSV são fundamentais para esta proteção. Infelizmente, o próprio PRRSV (em sua forma do tipo selvagem) ou as vacinas vivas atuais derivadas do mesmo possuem pouca capacidade de induzir anticorpos neutralizadores específicos ao vírus de uma maneira conveniente e em níveis eficientes (isto é, protetores).

A Patente U.S. Nº 6.500.662, "Infectious cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus e uses thereof" (por Calvert e outros, 31 de dezembro de 2002) descreve o desenvolvimento de um clone de cDNA de PRRSV Norte Americano infeccioso e seu uso como uma vacina. Entretanto, a Patente U.S. Nº 6.500.662 não divulga vacinas para PRRSV que compreendem antígenos de PRRSV hipoglicosilados.

Em um outro estudo, as seqüências da proteína GP5 (ou proteína do ORF5) de várias cepas de PRRSV Norte Americanas foram comparadas uma com as outras e ao isolado representativo de PRRSV Europeu conhecido como a cepa Lelystad, revelando que os sítios de glicosilação ligados a N na Asparagina 44 (N44) e na Asparagina 51 (N51) da seqüência consenso de GP5 eram conservados em todos os isolados de PRRSV verificados (Pirzadeh e outros, Can. J. Vet Res., 1998, 62: 170-177). Entretanto, o sítio de N-glicosilação localizado na Asparagina 31 (N31) da seqüência consenso de GP5 estava ausente em certos isolados de PRRSV Norte Americanos e ausente no isolado da cepa Lelystad de PRRSV européia. Proteínas de fusão GST-GP5 recombinantes de quatro (4) cepas de PRRSV Norte Americanas e a cepa Lelystad foram produzidas em *E. coli* na forma de corpos de inclusão insolúveis, renaturadas e utilizadas como agentes imunogênicos em coelhos. Tais proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* mantêm, mas não glicosilam seus sítios de N-glicosilação nativos.

Também foi mostrado que a inoculação de porcos com uma vacina de DNA que compreende uma fusão do promotor de CMV ao gene GP5

do isolado de PRRSV Norte Americano IAF-Klop fornece proteção em animais imunizados contra o desafio com PRRSV (Pirzadeh e Dea, 1998, J. General Virology, 79, 989-999). Este isolado do gene GP5 particular codifica uma proteína GP5 que contém os resíduos de Asparagina N31, N44 e N51 que são presumidamente glicosilados quando expressos em porcos imunizados com a vacina de DNA. A vacinação de porcos com GST-GP5 produzida por *E. coli*, que mantém, mas não glicosila os sítios de N-glicosilação do gene GP5 da cepa IAF-Klop, não protege os pulmões de porcos desafiados com o vírus.

Também foram descritos os clones infecciosos de PRRSV Europeu contendo mutações que resultam na expressão de proteínas de PRRSV hipoglicosiladas (Wissink e outros, 2004, J. Gen. Virol. 85: 3715-23). Esta referência particular relata que o PRRSV que contém mutações no Resíduo de Asparagina 53 (N53) na proteína GP(5) da cepa de PRRSV Lelystad que previne a glicosilação ligada a N de tal sítio é infeccioso e pode produzir partículas virais infecciosas da cepa de PRRSV. Em contraste, o PRRSV que contém mutações no N46 da proteína GP(5) de PRRSV Lelystad que previne a glicosilação ligada a N de tal sítio não é infeccioso e não produz partículas virais infecciosas da cepa de PRRSV Lelystad. Wissink e outros especulam que os sítios de N-glicano na proteína GP_{2a} de PRRSV Europeu e, por analogia, o sítio N53 da proteína GP5, poderiam atuar em níveis muito diferentes no hospedeiro natural, incluindo interações com o receptor ou proteção imunológica.

Em vírus sem ser o PRRSV, os resíduos de glicano foram implicados em uma variedade de funções. A glicosilação ligada a N, em geral, é importante para corrigir o dobramento, o alvo e a atividade biológica de proteínas (Helenius, A. e M. Aebi., Annu. Rev. Biochem. 73: 1019-1049, 2004.; Williams, D. B. e Glycoconj J., 12: iii-iv. 1995; Zhang, e outros, Glycobiology 14: 1229-46, 2004). Em muitos vírus envelopados, as proteínas do envelope são modificadas pela adição de porções de açúcar e a glicosilação ligada a N da proteína do envelope desempenha funções diversas de glicoproteínas virais tais como a ligação ao receptor, a fusão de membrana, a penetração

nas células e o brotamento viral (Braakman, I. e E. van Anken, Traffic 1: 533-9, 2000; Doms e outros Virology 193: 545-62, 1993). Estudos recentes demonstraram a função da glicosilação ligada a N da glicoproteína do vírus Hantaan no dobramento das proteínas e no tráfego intracelular (Shi, X. e R. M. Elliott, J. Virol. 78: 5414-22, 2004) assim como na atividade biológica e na antigenicidade da proteína hemaglutinina (HA) do vírus influenza (Abe, Y., e outros, J. Virol. 78: 9605-11, 2004). Além disso, se tornou evidente que a glicosilação de proteínas do envelope viral é um mecanismo principal para a evasão imunológica viral e para a persistência utilizada para vários vírus envelopados diferentes para escapar, bloquear ou minimizar a resposta de anticorpo que neutraliza os vírus. Os exemplos deste efeito foram relatados para SIV (Reitter, J. N. e outros, Nat. Med. 4: 679-84, 1998) e HIV-1 (Wei, X. e outros, Nature 422: 307-12, 2003), HBV (Lee, J. e outros. Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 427-32, 2003), influenza (Skehel, J. J. e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1779-83, 1984) e o arterivírus LDV (Chen, Z. e outros Virology 266: 88-98, 2000).

Sumário da Invenção

É em vista dos problemas anteriores que a presente invenção foi desenvolvida. É demonstrado que as variações hipoglicosiladas de uma proteína de superfície principal de PRRSV GP5 aumentavam o nível de anticorpos neutralizadores de PRRSV produzidos por porcos imunizados em relação aos níveis de anticorpos neutralizadores produzidos por porcos imunizados com a GP5 do tipo selvagem (wt) ou glicosilada.

Esta invenção fornece primeiramente um método de ativação de uma resposta imunológica melhorada em um porco a um antígeno do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV), que compreende a administração de uma composição que compreende um polinucleotídeo que codifica uma variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondente à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado. Em certas modalidades do método, pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondente à asparagina 34 ou à aspara-

gina 51 na SEQ ID NO: 1 é inativado. Este polinucleotídeo pode compreender uma molécula de RNA infecciosa de PRRSV ou uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA infecciosa de PRRSV. A molécula de RNA infecciosa de PRRSV é um derivado de PRRSV Norte Americano ou um derivado de PRRSV Europeu. Alternativamente, este polinucleotídeo pode compreender uma molécula de DNA em que um promotor ativo em células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica uma proteína GP5 hipoglicosilada. Este promotor é um promotor de CMV em certas modalidades preferidas da invenção. Alternativamente, o polinucleotídeo pode ser um vetor viral. Os vetores virais representativos que podem ser utilizados incluem vetores do vírus vaccinia, vetores virais de herpes simplex, vetores de adenovírus, vetores de alfavírus e vetores de TGEV.

Uma variedade de tipos e fontes de seqüências de PRRSV pode ser utilizada para a obtenção do polinucleotídeo que codifica uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondente à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado. Em certas modalidades da invenção, um polinucleotídeo que codifica uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada é obtido através da síntese direta, da mutagênese de uma seqüência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV Norte Americano ou da mutagênese de uma seqüência de nucleotídeos de GP5 de PRRSV Norte Americano. A seqüência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV Norte Americano pode ser selecionada do grupo de nucleotídeos que codifica as proteínas GP5 da SEQ ID NO: 1, da SEQ ID NO: 2, da SEQ ID NO: 3, da SEQ ID NO: 4, da SEQ ID NO: 5, da SEQ ID NO: 6, da SEQ ID NO: 7, da SEQ ID NO: 8, da SEQ ID NO: 9, da SEQ ID NO: 10, da SEQ ID NO: 11, da SEQ ID NO: 12 e da SEQ ID NO: 13. A seqüência de nucleotídeos consenso de GP5 de PRRSV Norte Americano codifica uma proteína GP5 consenso que é pelo menos 85% idêntica a SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades da invenção, o polinucleotídeo que codifica uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosi-

lada é obtido através da síntese direta, da mutagênese de uma sequência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV Europeu ou da mutagênese de uma sequência de nucleotídeos de GP5 consenso de PRRSV Europeu. A sequência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV Europeu codifica
5 uma proteína GP5 que é pelo menos 85% idêntica à SEQ ID NO: 15.

Uma variedade de métodos de inativação dos sítios de glicosilação ligada a N especificados pode ser utilizada para a prática eficiente do método desta invenção. Um método preferido de inativação de um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 é substituir o códon
10 de asparagina por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina. Este códon de substituição pode codificar um resíduo de alanina ou de glutamina. Em modalidades mais preferidas, ambos os ditos sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 estão inativados. Em ou-
15 tras modalidades, o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 está inativado. Este sítio de glicosilação ligada a N da asparagina 34 pode ser inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 34 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina. O códon que codifica um outro aminoácido pode codificar um resí-
20 duo de alanina ou de glutamina. Em outras modalidades preferidas, ambos os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência podem ser inativados através da substituição de códons que codificam a asparagina 34 e a asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina. Ambos
25 os códons que codificam a asparagina 34 e a asparagina 51 podem ser substituídos por códons que codificam um resíduo de alanina ou de glutamina para inativar tais sítios de glicosilação. Alternativamente, ambos códons podem ser substituídos por códons que codificam um resíduo de alanina para inativar ambos os sítios de glicosilação. Alternativamente, um dos sítios
30 de glicosilação ligados a N é inativado pela substituição de um códon que codifica a dita asparagina 34 ou a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina enquanto que o outro sítio de gli-

cosilação ligada a N é inativado por outras técnicas.

Em modalidades preferidas, o método emprega uma molécula de RNA infecciosa de PRRSV que é um derivado do PRRSV Norte Americano que codifica uma proteína variante do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado. Em modalidades mais preferidas, ambos os ditos sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 estão inativados. Ambos os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência podem ser inativados através da substituição dos códons que codificam a asparagina 34 e a asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina. Ambos os códons que codificam a asparagina 34 e a asparagina 51 podem ser substituídos por códons que codificam um resíduo de alanina ou de glutamina para inativar tais sítios de glicosilação. Alternativamente, ambos os códons podem ser substituídos por códons que codificam um resíduo de alanina para inativar tal sítio de glicosilação.

Para a prática deste método, a composição que contém o polinucleotídeo é administrada através de injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeção intradermal, injeção parenteral, injeção intramuscular, injeção isenta de agulha, eletroporação, fornecimento oral, fornecimento, intranasal, fornecimento oronasal ou qualquer combinação dos mesmos. A composição administrada pode compreender ainda um veículo terapeuticamente aceitável. Este veículo terapeuticamente aceitável é selecionado do grupo que consiste em uma proteína, um tampão, um tensoativo e um polímero de polietileno glicol ou qualquer combinação dos mesmos.

A composição administrada pode compreender ainda um adjuvante. Este adjuvante pode ser hidróxido de alumínio, Quil A, uma interrupção brusca em gel de alumina, óleos minerais, glicerídeos, ácidos graxos, subprodutos de ácidos graxos, micobactérias e oligodesoxinucleotídeos CpG ou qualquer combinação dos mesmos. Uma composição administrada tam-

bém pode compreender um segundo adjuvante tal como interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL4, IL-5, IL6, IL- 12, interferon gama (g-IFN), fator de necrose celular, MDP (muramil dipeptídeo). complexo imuno estimulante (ISCOM) e lipossomos.

5 A resposta imunológica melhorada de um porco a um antígeno de PRRSV pode compreender a maior produção de anticorpos neutralizadores de PRRSV pelo dito porco. A maior produção de anticorpos neutralizadores de PRRSV é tipicamente observada após a imunização do porco através dos métodos e das composições desta invenção. A resposta imunológica
10 melhorada pode ser obtida em uma porca, uma leitoa, um porco não castrado ou um leitão.

 A invenção fornece ainda um método de ativação de uma resposta imunológica melhorada em um porco a um antígeno do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV), que compreende a administração de uma composição que compreende uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado no dito porco. A proteína variante do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada pode
15 ser produzida pelos mesmos polinucleotídeos utilizados nos métodos descritos anteriormente em sistemas bacterianos, de levedura ou de mamíferos.

 A presente invenção fornece ainda composições que compreendem um polinucleotídeo que codifica um variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado e um veículo terapeuticamente aceitável. Em certas modalidades, as composições compreendem polinucleotídeos em que ambos os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 na SEQ ID NO: 1 estão inativados. Em modalidades preferidas, esta composição pode compreender
25 uma molécula de RNA infecciosa do PRRSV Norte Americano ou uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA infecciosa do PRRSV Norte
30

Americano. Em outras modalidades, o polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA em que um promotor ativo em células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica a dita variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada. Em certas modalidades preferidas, este promotor é um promotor do CMV. Ainda em outras modalidades, o polinucleotídeo na composição compreende um vetor viral. Os vetores virais que podem ser utilizados na composição podem ser qualquer um de um vetor do vírus vaccinia, um vetor viral de herpes simplex, um vetor de adenovírus, um vetor de alfavírus e um vetor de TGEV.

Nos polinucleotídeos da composição, um sítio de glicosilação ligada a N é inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina. O códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina codifica um resíduo de alanina ou de glutamina. Em outras modalidades desta composição, um sítio de glicosilação ligada a N adicional é inativado através da substituição de um códon que codifica a asparagina 34 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina. Este códon que codifica um outro aminoácido pode codificar um resíduo de alanina ou de glutamina. As composições preferidas que compreendem os polinucleotídeos que codificam uma proteína variante do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada em que ambos os ditos sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência Norte Americana da SEQ ID NO: 1 estão inativados e são assim fornecidos por este pedido de patente. Ambos os ditos sítios de glicosilação ligada a N podem ser inativados através da substituição dos códons que codificam a dita asparagina 34 e a dita asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina. Estes códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina podem codificar um resíduo de alanina ou de glutamina.

O veículo terapeuticamente aceitável utilizado na composição pode ser uma proteína, um tampão, um tensoativo e um polímero de polietileno glicol ou qualquer combinação dos mesmos. A composição compreen-

de ainda pelo menos um adjuvante. Este adjuvante pode ser hidróxido de alumínio, Quil A, uma interrupção brusca em gel de alumina, óleos minerais, glicerídeos, ácidos graxos, subprodutos de ácidos graxos, micobactérias e oligodesoxinucleotídeos CpG ou qualquer combinação dos mesmos. A composição pode compreender ainda um segundo adjuvante selecionado do grupo que consiste em interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, interferon gama (g-IFN), fator de necrose celular, MDP (muramil dipeptídeo), complexo imuno estimulante (ISCOM) e lipossomos.

Uma composição que compreende uma variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado e um veículo terapeuticamente aceitável é também fornecida por esta invenção. Em modalidades preferidas, os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 estão inativados. A proteína variante do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada pode ser produzida pelos mesmos polinucleotídeos utilizados nos métodos previamente descritos em sistemas de expressão bacterianos, de leveduras ou de mamíferos.

A presente invenção fornece ainda polinucleotídeos isolados que codificam uma variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado. Em certas modalidades, são fornecidos os polinucleotídeos em que ambos os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 na SEQ ID NO: 1 estão inativados. Em modalidades preferidas, este polinucleotídeo isolado pode compreender uma molécula de RNA infecciosa do PRRSV Norte Americano ou uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA infecciosa do PRRSV Norte Americano. Em outras modalidades, o polinucleotídeo isolado compreende uma molécula de DNA em que um promotor ativo nas células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica a dita

variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada. Em certas modalidades preferidas, este promotor é um promotor do CMV. Ainda em outras modalidades, o polinucleotídeo isolado compreende um vetor viral. Os vetores virais que podem ser utilizados na composição podem ser qualquer um de um vetor de vírus vaccinia, um vetor viral de herpes simplex, um vetor de adenovírus, um vetor de alfavírus e um vetor de TGEV.

Nos polinucleotídeos isolados um sítio de glicosilação ligada a N é inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina. O códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina codifica um resíduo de alanina ou de glutamina. Em outras modalidades preferidas, um sítio de glicosilação ligada a N adicional é inativado através da substituição de um códon que codifica a asparagina 34 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina. Este códon que codifica um outro aminoácido pode codificar um resíduo de alanina ou de glutamina. São fornecidos os polinucleotídeos preferidos que codificam uma proteína variante do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada em que ambos os ditos sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência Norte Americana da SEQ ID NO: 1 estão inativados. Ambos os ditos sítios de glicosilação ligada a N podem ser inativados através da substituição dos códons que codificam a dita asparagina 34 e a dita asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina. Estes códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina podem codificar um resíduo de alanina ou de glutamina.

A invenção fornece ainda um polipeptídeo isolado que é uma variação do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado. A proteína variante do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada isolada pode ser produzida pelos mesmos polinucleotídeos utilizados nos métodos previamente descritos nos sistemas de expressão bacterianos, de

leveduras ou de mamíferos e purificada por cromatografia ou outras técnicas.

As características e as vantagens adicionais da presente invenção, assim como a estrutura e a operação de várias modalidades da presente invenção, estão descritas em detalhes abaixo com referência às figuras em anexo.

Breve Descrição das Figuras

As figuras em anexo, que são incorporadas e que constituem uma parte do relatório descritivo, ilustram as modalidades da presente invenção e junto com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção. Nas figuras:

A Figura 1 ilustra a Expressão transitória da proteína GP5 e M do PRRSV. A. Esquema do constructo bicistrônico que mostra as regiões que codificam GP5 e M que flanqueiam o IRES (IE) do vírus da encefalomiocardite. As regiões codificadoras estão sob o controle do promotor da RNA polimerase de T7 (retângulo em preto) presente a montante da região codificadora de GP5. A seta dobrada mostra a posição e a direção da transcrição pela RNA polimerase de T7 do vetor. B. Expressão das proteínas GP5 e M em células transfectadas com o vetor bicistrônico. As células transfectadas de forma simulada (faixa 1) ou transfectadas com o plasmídeo (faixas 2-7) foram marcadas de forma radioativamente como descrito em Materiais e Métodos, imunoprecipitadas com o anticorpo anti-Gp5 (faixas 1-5) ou com o anticorpo anti-M (faixas 6-7). As proteínas imunoprecipitadas foram mantidas não-tratadas (-) (faixas 1, 2, 6 e 7) ou tratadas (+) com Endo H (faixa 3), PNGase F (faixa 4) e analisadas por eletroforese. A faixa 5 contém proteínas imunoprecipitadas provenientes de células transfectadas tratadas (+) com tunicamicina. É mostrada a mobilidade das proteínas com massa molecular relativa (Mr) em quilodáltons.

A Figura 2 ilustra a análise da glicosilação de WT-GP5 e seus mutantes utilizando um plasmídeo bicistrônico. A. Representação esquemática do vetor bicistrônico e da GP5 do PRRSV com os três supostos sítios de glicosilação nas posições de aminoácidos 34, 44 e 51 mostradas. B. Vários

mutantes foram utilizados no presente estudo. C. Expressão da GP5 do tipo selvagem e mutante e sua sensibilidade a Endo H. O experimento foi realizado como descrito na legenda da Figura 1, as proteínas foram imunoprecipitadas com o anticorpo anti-GP5, digeridas com Endo H (+) ou deixadas não-digeridas (-) e analisadas por eletroforese. As proteínas GP5 mutantes são mostradas por pontas de setas. A mobilidade das proteínas com massa molecular relativa (Mr) em quilodáltons é mostrada à direita.

A Figura 3 ilustra a caracterização de vírus mutantes que codificam GP5 mutante. A. Cinética de crescimento em uma única etapa de PRRSVs do tipo selvagem (FL-12) e vários mutantes em células MARC-145. As células em placas de seis cavidades foram infectadas com PRRSV a uma MOI de 3, os sobrenadantes de cultura foram coletados nos tempos indicados após a infecção e os títulos virais foram determinados. São mostrados os títulos médios com desvio padrão (barras de erros) proveniente dos três experimentos independentes. B. Morfologia de placas de vírus mutantes. As setas vazadas e as pontas de setas exibem placas que são menos evidentes. C. Transcomplementação para a recuperação de PRRSVs mutantes. Análise quantitativa da recuperação de vírus mutantes partindo de células que expressam a proteína GP5 do tipo selvagem. É mostrado o rendimento médio de vírus provenientes de três experimentos independentes com desvio padrão (representado por barras de erros).

A Figura 4 ilustra uma verificação da GP5 incorporada em virions mutantes e sintetizada em células infectadas por vírus. A. Os virions radiorrotulados provenientes dos sobrenadantes de cultura de células infectadas foram peletizados, a proteína GP5 foi imunoprecipitada, tratada com (+) ou sem (-) Endo H e analisada por eletroforese. A GP5 com e sem digestão com Endo H nas faixas 1 e 2 é mostrada por colchetes brancos. B. As células infectadas com vários vírus mutantes foram radiorrotuladas, a GP5 foi imunoprecipitada, tratada com (+) ou sem (-) Endo H e analisada por eletroforese. A GP5 com e sem digestão com Endo H nas faixas 2 e 3 é mostrada por colchetes brancos. A mobilidade das proteínas com massa molecular relativa (Mr) em quilodáltons é mostrada do lado direito de cada painel.

A Figura 5 ilustra um alinhamento de seqüências de aminoácidos N-terminais de GP5 do PRRSV Norte Americano com a seqüência N-terminal de referência de GP5 do PRRSV Norte Americano (SEQ ID NO: 1; cepa NVSL 97-7895). São mostrados os primeiros 60 aminoácidos N-terminais de um alinhamento das proteínas de 200 aminoácidos. Os sítios de glicosilação ligada a N da asparagina 34 "NSS" e da asparagina 51 "NGT" nas proteínas são mostrados em negrito. Outros sítios de glicosilação ligada a N localizados entre os resíduos 29 e 35 da proteína GP5 de referência estão sublinhados.

A Figura 6 ilustra um alinhamento da seqüência de aminoácidos N-terminais do PRRSV europeu com a seqüência N-terminal de referência de GP5 do PRRSV Norte Americano (SEQ ID NO: 1; cepa NVSL 97-7895). Um alinhamento da proteína GP5 inteira de proteínas de aproximadamente 200 aminoácidos é mostrando quando um sítio de glicosilação ligada a N da asparagina 51 "NGT" é mostrado em negrito (isto é, a asparagina 53 na SEQ ID NO: 15).

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Definições:

"Veículo aceitável", como utilizado aqui, se refere a um veículo que não é deletério aos outros ingredientes da composição e não é deletério ao material ao qual será aplicado. "Veículo terapeuticamente aceitável" se refere a um veículo que não é deletério aos outros ingredientes da composição e não é deletério ao receptor humano ou outro animal do mesmo. No contexto dos outros ingredientes da composição, "não-deletério" significa que o veículo não-reagirá com ou degradará os outros ingredientes ou interferirá com a eficiência dos mesmos. A interferência com a eficiência de um ingrediente não abrange a mera diluição do ingrediente. No contexto do animal, "não deletério" significa que o veículo não é prejudicial ou letal à planta ou ao animal.

"Adjuvante", como utilizado aqui, se refere a qualquer material utilizado em associação com um antígeno que aumenta a capacidade de tal antígeno para a indução de uma resposta imunológica.

"Administração", como utilizado aqui, se refere a quaisquer meios de fornecimento de um polinucleotídeo, um polipeptídeo ou uma composição do mesmo a um indivíduo. Os exemplos não limitantes de meios de administração incluem injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeção intradermal, injeção parenteral, injeção intramuscular, injeção isenta de agulha, eletroporação, fornecimento oral, fornecimento intranasal, fornecimento oronasal ou qualquer combinação dos mesmos.

"Antígeno", como utilizado aqui, se refere a qualquer entidade que induza uma resposta imunológica em um hospedeiro.

"Seqüência consenso", como utilizado aqui, se refere a uma seqüência de aminoácidos, de DNA ou de RNA criada através do alinhamento de duas ou mais seqüências homólogas e que deriva de uma nova seqüência que representa a seqüência de aminoácidos, de DNA ou de RNA comum.

"Variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada", como utilizado aqui, se refere às proteínas GP5 do PRRSV em que a seqüência de aminoácidos original ou não-variante que compreende um ou mais sítios de glicosilação ligada a N foram alteradas de forma a reduzir o número de sítios de glicosilação ligada a N na proteína variante de GP5 resultante. Sob esta definição, a expressão de uma proteína GP5 original ou não variante em *E. coli* para a produção de uma proteína GP5 com a seqüência de GP5 original contendo o mesmo número de sítios de glicosilação não resultaria na produção de uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada.

"Resposta imunológica", como utilizado aqui, se refere à produção de anticorpos e/ou de células (tais como linfócitos T) que se ligam, degradam ou inibem de outra maneira um antígeno particular. As expressões relacionadas tal como "uma resposta imunológica melhorada" se referem ao uso dos métodos e das composições que resultam em qualquer melhoria que possa ser medida na resposta de um hospedeiro imunizado para um antígeno. Por exemplo, as melhorias que podem ser medidas em uma resposta imunológica incluem, mas não estão limitadas, à maior produção de

anticorpos neutralizadores (isto é, maiores títulos de anticorpos) em relação aos níveis de produção observados nos animais de controle que foram imunizados com antígenos que não possuem as modificações estruturais que são responsáveis por uma resposta imunológica melhorada.

5 "Molécula de RNA infecciosa" se refere a uma molécula de RNA que codifica todos os elementos necessários para a produção de um virion funcional quando introduzido em uma célula hospedeira permissiva.

"Clone infeccioso", como utilizado aqui, se refere a uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA infecciosa.

10 "PRRSV Norte Americano", como utilizado aqui, se refere a qualquer PRRSV que compreende seqüências de polinucleotídeos associado com isolados do PRRSV Norte Americano, tal como, mas não limitado à cepa NVSL 97-7895 (Truong e outros, Virology, 325: 308-319 e referências contidas no mesmo) ou cepas IAF-Klop, MLV, ATCC VR-2332, ATCC VR-
15 2385, IAF-BAJ, IAF-DESR, IAF-CM, IAF 93-653, IAF 93-2616, IAF 94-3182, IAF 94-287 descritas em Pirzadeh e outros Can. J. Vet Res, 62: 170-177 e referências contidas no mesmo. Para esta invenção, o PRRSV que compreende as seqüências de polinucleotídeos associadas com um isolado do PRRSV Norte Americano são PRRSV que contêm seqüências de polinucleotídeos em que a região que codifica GP5 codifica um polipeptídeo que possui
20 pelo menos 85% de identidade de seqüência com a proteína em relação à SEQ ID NO: 1.

"PRRSV Europeu", como utilizado aqui, se refere a qualquer PRRSV que compreende seqüências de polinucleotídeos associadas com
25 um isolado do PRRSV Norte Americano, tal como, mas não limitado à cepa Lelystad (Wissink e outros, J. Gen. Virol. 85: 3715, 2004 e referências contidas no mesmo). Para esta invenção, o PRRSV que compreende as seqüências de polinucleotídeos associadas com um isolado do PRRSV Europeu são PRRSV que contêm seqüências de polinucleotídeos em que a região
30 que codifica GP5 codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 85% de identidade de seqüência com a proteína em relação à SEQ ID NO: 15.

"Porcentagem de identidade", como utilizado aqui, se refere ao

número de elementos (isto é, aminoácidos ou nucleotídeos) em uma sequência que é idêntico dentro de um comprimento definido de dois segmentos de DNA, RNA ou proteína alinhados de forma ótima. Para calcular a "porcentagem de identidade", o número de elementos idênticos é dividido pelo número total de elementos no comprimento definido dos segmentos alinhados e multiplicado por 100. Quando a porcentagem de identidade é utilizada em referência às proteínas, é entendido que certos resíduos de aminoácidos podem não ser idênticos, mas são, todavia, substituições conservativas de aminoácidos que refletem substituições de resíduos de aminoácidos com propriedades químicas similares (por exemplo, resíduos ácidos ou básicos, hidrofóbicos, hidrofílicos, doadores ou receptores de ligação de hidrogênio). Tais substituições podem não alterar as propriedades funcionais da molécula. Conseqüentemente, a porcentagem de identidade de seqüências de proteínas pode ser aumentada para considerar substituições conservativas.

Introdução

A glicoproteína 5 (GP5) do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) é a glicoproteína de envelope mais abundante e um indutor principal de anticorpos neutralizadores *in vivo*. Três supostos sítios de glicosilação ligada a N (N34, N44 e N51) ficam localizados no ectodomínio da GP5, onde existe também um epitopo de neutralização principal. Para determinar quais destes supostos sítios de glicosilação são utilizados no ciclo de vida do PRRSV e a função dos grupamentos de glicano na indução de anticorpos neutralizadores, foi gerado um conjunto de mutantes de GP5 contendo substituições de aminoácidos isoladas e múltiplas nestes sítios. A expressão transitória de proteínas do tipo selvagem (wt) assim como mutantes e os estudos bioquímicos subseqüentes revelaram que a GP5 madura contém alto conteúdo de grupamentos de açúcar do tipo manose em todos os três sítios. Estas mutações foram subseqüentemente incorporadas em um clone de cDNA de comprimento completo para a recuperação de PRRSV infeccioso. Os resultados dos presentes inventores demonstram que mutações envolvendo o resíduo N44 não resultavam na produção de progênie

infecçiosa, indicando que N44 é o resíduo de aminoácido mais crítico para a capacidade de infecção viral. Os vírus que carregam mutações em N34, N51 e N34/51 cresceram em títulos mais baixos que o PRRSV do tipo selvagem e exibiam efeito citopático reduzido nas células MARC 145. Nos ensaios de neutralização no soro, os vírus mutantes exibiam sensibilidade à neutralização por anticorpos específicos ao PRRSV do tipo selvagem. Além disso, a inoculação de porcos com os vírus mutantes induziu níveis significativamente maiores de anticorpos neutralizadores contra o PRRSV mutante assim como do tipo selvagem, sugerindo assim que a perda de resíduos de glicano no ectodomínio de GP5 aumenta tanto a sensibilidade destes vírus à neutralização *in vitro* assim como a imunogenicidade do epitopo de neutralização próximo. Estes resultados devem ter grande significância para o desenvolvimento de vacinas para PRRSV de eficiência protetora melhorada.

Os anticorpos neutralizadores são conhecidos como sendo um correlativo principal de proteção contra o PRRSV. Foi descoberto que a eliminação dos sítios de glicosilação na GP5 proteína do PRRSV resulta no aumento significativo: (1) da capacidade da cepa de PRRSV modificada de ser neutralizada por um anti-soro convalescente do PRRSV e (2) da capacidade desta cepa de PRRSV modificada de produzir níveis sem precedente de anticorpos neutralizadores para PRRSV quando utilizada para inocular porcos. A aplicação deste conceito em qualquer vírus vivo (do tipo selvagem ou atenuado) utilizado para a imunização contra a infecção pelo PRRSV teria impacto significativo sobre este uso para conferir proteção eficiente contra a infecção pelo PRRSV.

Atualmente, há três abordagens principais para a imunização contra infecções causadas pelo PRRSV: (1) vacinas atenuadas vivas, (2) vacinas inativadas (que se baseam no crescimento do PRRSV do tipo selvagem *in vitro* e quimicamente inativados) e (3) uso da infecção intencional com o PRRSV do tipo selvagem virulento de uma maneira sistemática em todos os animais do rebanho. Há muita discussão e controvérsia em relação a qual destas 3 formas é mais eficiente. A presente invenção seria benéfica, independentemente da abordagem utilizada para imunização. A alteração

genética de um PRRSV vivo para modificar o nível de glicosilação de suas proteínas pode ser feita na cepa vacinal de PRRSV atenuada ou na cepa de PRRSV do tipo selvagem utilizada para produzir uma vacina inativada ou na cepa de PRRSV do tipo selvagem para a inoculação direta do rebanho por infecção em massa.

O vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) pertence à família *Arteriviridae* dentro da ordem *Nidovirales* que inclui ainda o vírus da arterite eqüina (EAV), o vírus de elevação da lactate desidrogenase (LDV) e o vírus da febre hemorragia de símios (SHFV). O genoma viral é uma molécula de RNA de filamento positivo linear de aproximadamente 15,0 kb de comprimento e possui uma estrutura cap na extremidade a 5' e uma cauda poli(A) na extremidade a 3'. Oito quadros abertos de leitura (ORF) são codificados no genoma viral. Os dois primeiros quadros abertos de leitura (ORF1a e ORF1ab) codificam poliproteínas virais não-estruturais (NS) que estão envolvidas no processamento de poliproteínas e na transcrição e na replicação do genoma. As proteínas estruturais virais, codificadas no ORF2-7, são expressas partindo dos seis mRNAs com cap e poliadenilados subgenômicos que são sintetizados na forma do conjunto aninhado co-terminal a 3' de mRNAs com uma seqüência líder comum na extremidade a 5'. A proteína de envelope viral principal é a glicoproteína 5 (GP5), que é codificada no ORF5 do genoma viral. A GP5 é uma proteína transmembrana glicosilada com aproximadamente 25 kDa de tamanho. Possui um suposto peptídeo sinal N-terminal e possui três sítios de glicosilação ligada a N potenciais que ficam localizados em um ectodomínio pequeno que compreende os primeiros 40 resíduos da proteína madura. No EAV e no LDV, a glicoproteína de envelope principal forma um heterodímero ligado por dissulfeto com o produto gênico do ORF6, a proteína de matriz viral (M). A interação similar entre a GP5 e a proteína M do PRRSV foi observada, mas o modo de interação ainda não foi identificado. Foi postulado que a formação de heterodímeros das proteínas GP5 e M pode desempenhar uma função crítica na montagem do PRRSV infeccioso. Em adição a sua função na montagem do vírus, a GP5 parece estar envolvida na entrada do vírus em células hospedeiras susceptí-

veis. É presumido que a GP5 interage com o receptor da célula hospedeira, sialoadesina para a entrada nos macrófagos alveolares suínos (PAMs), as células-alvo *in vivo* para o PRRSV. A função da GP5 no reconhecimento do receptor é sustentada pela presença de um epítipo de neutralização principal no ectodomínio N-terminal, implicando assim em uma função central para o ectodomínio da GP5 no processo de infecção.

As glicanas ligadas a N do ectodomínio da GP5 podem ser críticas para o funcionamento apropriado da proteína. A glicosilação ligada a N, em geral, é importante para o dobramento correto, para o alvo e para a atividade biológica das proteínas. Em muitos vírus envelopados, as proteínas do envelope são modificadas através da adição de grupamentos de açúcar e a glicosilação ligada a N da proteína do envelope desempenha funções diversas de glicoproteínas virais tais como a ligação ao receptor, a fusão com membranas, a penetração nas células e o brotamento do vírus. Estudos recentes demonstraram a função da glicosilação ligada a N da glicoproteína do vírus Hantaan no dobramento de proteínas e no tráfego intracelular assim como na atividade biológica e na antigenicidade da proteína hemaglutinina (HA) do vírus influenza. Além disso, se tornou evidente que a glicosilação das proteínas do envelope viral é um mecanismo principal para a evasão imunológica viral e para a persistência utilizada por vários vírus envelopados diferentes para escapar, bloquear ou minimizar a resposta de anticorpos neutralizadores do vírus. Os exemplos deste efeito foram relatados para SIV e HIV-1, HBV, influenza e, de forma mais importante, no caso do PRRSV, o arterivírus LDV.

Recentemente o desenvolvimento de sistemas genéticos inversos para o PRRSV foi relatado por vários laboratórios incluindo o dos presentes inventores. Evidentemente, estudos de mutação com clones infecciosos levaram a um melhor entendimento dos mecanismos de transcrição e de replicação do genoma viral dos arterivírus. Assim, com a finalidade de verificar a importância da glicosilação ligada a N na atividade biológica da GP5 do PRRSV na produção de vírus infecciosos ou na ativação de anticorpos neutralizadores *in vivo*, foi construída uma série de proteínas GP5 mutantes em

que cada um dos sítios de glicosilação ligada a N potenciais foi mutado individualmente ou em várias combinações. As proteínas mutantes resultantes foram verificadas em relação ao seu padrão de glicosilação, sua função na recuperação de vírus infecciosos e na neutralização cruzada por anticorpos produzidos, através de inoculações experimentais, contra o PRRSV do tipo selvagem ou contra os vírus mutantes. Os dados dos presentes inventores mostram que todos os três supostos sítios de glicosilação são utilizados para a glicosilação com glicanas do tipo de alto conteúdo de manose e a glicosilação da proteína GP5 no resíduo 44 é crítica para a recuperação do PRRSV infeccioso. De maneira muito importante, os dados dos presentes inventores partindo da neutralização e dos estudos de resposta de anticorpos indicam que a infecção natural com o PRRSV pode envolver uma evasão imunológica baseada nos mecanismos de proteção das glicanas como foi previamente descrito para outros vírus, ajudando assim a explicar a resposta imunológica humoral protetora bastante ineficiente que é observada nos animais infectados pelo PRRSV.

Sítios de Glicosilação Ligada a N e Métodos de Inativação

A glicosilação ligada a N nas glicoproteínas ocorre tipicamente nas seqüências Asn-Xaa-Ser/Thr (NXS/T), em que Xaa (X) é qualquer resíduo de aminoácido exceto Pro. Uma variedade de mutações pode ser introduzida nos sítios de glicosilação ligada a N para fornecer a sua inativação. Um método preferido de inativação compreende a substituição do resíduo de asparagina por um resíduo que codifica qualquer aminoácido sem ser a asparagina. Em modalidades mais preferidas desta invenção, o resíduo de asparagina é substituído por um resíduo de alanina ou de glutamina.

Outros métodos de inativação de sítios de glicosilação ligada a N e, em particular, dos sítios de glicosilação ligada a N correspondendo às asparaginas 34 e/ou 51 da proteína de referência GP5 da SEQ ID NO: 1, também são considerados aqui. As substituições de certos aminoácidos tal como prolina, triptofano, aspartato, glutamato ou Leucina na posição Xaa também podem ser utilizadas para inativar os sítios de glicosilação ligada a N (Kasturi e outros, Biochem J. 323 (2): 415-9, 1997). Alternativamente, as

substituições da posição de hidróxi aminoácido final do sítio de glicosilação ligada a N (isto é, o resíduo de serina ou de treonina da seqüência NXS/T) por qualquer aminoácido sem ser hidróxi (isto é, qualquer aminoácido sem ser serina ou treonina) podem ser também utilizadas para inativar o sítio de glicosilação ligada a N. Os exemplos de aminoácidos sem ser hidróxi que foram utilizados para inativar os sítios de glicosilação ligada a N incluem cisteína (Kasturi e outros, J. Biol. Chemistry 270(24), 14756-14761, 1995).

Em adição às substituições de aminoácidos, outros tipos de mutações que inativam os sítios de glicosilação ligada a N tais como inserções de aminoácidos ou deleções de aminoácidos são também considerados por esta invenção. Os versados na técnica considerarão que um sítio de glicosilação ligada a N pode ser facilmente inativado por deleções que removem aminoácidos chaves na seqüência NXS/T (isto é, os resíduos de asparagina) e resultarão na inativação de tal sítio de glicosilação. As deleções do resíduo X ou do resíduo serina/treonina podem similarmente inativar certos sítios de glicosilação ligada a N em que o resíduo S ou T não é seguido por um outro resíduo S ou T na seqüência que ocorre naturalmente. Quando X for um aminoácido sem ser hidróxi (isto é, não for serina ou treonina), as inserções de qualquer resíduo de aminoácido na extremidade carbóxi terminal do resíduo N podem inativar o sítio de glicosilação ligada a N. As inserções de quaisquer aminoácidos sem ser hidróxi na extremidade carbóxi terminal do resíduo X também podem inativar o sítio de glicosilação ligada a N.

Em resumo, é entendido que a característica chave da mutação utilizada para a prática da invenção é que esta inativa a glicosilação ligada a N nos sítios de asparagina 34 e/ou de asparagina 51 em uma proteína GP5. Embora não esteja ligado à teoria, acredita-se que a característica chave destas mutações são que estas previnem a glicosilação em uma certa região da proteína (isto é, resíduos que correspondem sítios de asparagina 34 e/ou de asparagina 51 em uma proteína de referência GP5 da SEQ ID NO: 1). Previnindo a glicosilação nestes sítios, os resíduos de açúcar que comumente escondem os epitopos chaves do vírus do tipo selvagem são removidos, permitindo assim a ativação de uma resposta imunológica melhorada. Con-

seqüentemente, é esperado que um número de tipos diferentes de mutações (isto é, substituição, inserção ou deleção de aminoácidos) possa ser utilizado para inativar os sítios de glicosilação ligada a N identificados e para a obtenção de um antígeno que ativar a resposta imunológica melhorada.

5 Descrição dos polinucleotídeos e dos polipeptídeos do PRRSV da invenção

Os métodos desta invenção podem ser praticados com uma variedade de polinucleotídeos diferentes que podem ser derivados de uma variedade de fontes diferentes. A característica comum de todos os polinucleotídeos é que codificam uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada em que os sítios de glicosilação ligada a N que correspondem à asparagina 34, à asparagina 51 ou tanto à asparagina 34 quanto à asparagina 54 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 estão inativados. Para a identificação dos sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 54 na proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1, a seqüência do polipeptídeo GP5 do PRRSV não variante e normalmente glicosilada pode ser alinhada com a proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1. Os exemplos de tal alinhamento são mostrados nas Figuras 5 e 6. As seqüências particulares utilizadas neste alinhamento são descritas na Tabela 1.

20 Tabela 1. Descrição de Seqüências

Descrição	Acesso do GenBank (Referência)	SEQ ID NO:
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano NVSL 97-7895	<u>AAS59265.1</u> (Troung, H.M., et al. Virology 325 (2), 308-319, 2004)	SEQ ID NO: 1
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano 1. IAF-Klop Proteína GP5	<u>AAC41206.1</u>	SEQ ID NO:2
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano IAF-BAJ	<u>AAC41209.1</u>	SEQ ID NO:3

Descrição	Acesso do GenBank (Referência)	SEQ ID NO:
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano IAF-DESR	<u>AAC41212.1</u>	SEQ ID NO:4
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano IAF 93-653	<u>AAC41215.1</u>	SEQ ID NO:5
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano IAF 93-2616	<u>AAC41218.1</u>	SEQ ID NO:6
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano 94-3182	<u>AAC41221.1</u>	SEQ ID NO:7
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano 94-287	<u>AAC41224.1</u>	SEQ ID NO:8
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano IAF-CM	<u>AAC28399.1</u> (com Ser 106 como por Pirzadeh, B., et al. Can. J. Vet. Res. 62 (3), 170-177 (1998))	SEQ ID NO:9
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano ONT-TS	<u>AAC41227.1</u>	SEQ ID NO:10
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano VR-2332	<u>AAD12129.1</u>	SEQ ID NO:11
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano VR-2385	<u>AAA67155.1</u>	SEQ ID NO:12
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano MLV	<u>AAD27656.1</u>	SEQ ID NO:13
Proteína GP5 Cepa do PRRSV norte-americano Consenso	Pirzadeh, B., et al. Can. J. Vet. Res. 62(3), 170-177 (1998)	SEQ ID NO:14

Descrição	Acesso do GenBank (Referência)	SEQ ID NO:
Proteína GP5 Cepa do PRRSV europeu LV	<u>AAA47105.1</u>	SEQ ID NO:15
DNA do clone Infeccioso do PRRSV Cepa do PRRSV norte-americano NVSL 97-7895	<u>AAS59265.</u> (Trough, H.M., et. a. Virology 325 (2), 308-319, 2004)	SEQ ID NO:16
DNA do clone Infeccioso do PRRSV Cepa do PRRSV norte-americano VR-2332	<u>AY150564.</u> (Nielsen, H.S., et al., J. Virol. 77 (6), 3702-3711, 2003)	SEQ ID NO:17

Para identificar os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 que podem ser inativados e utilizados nos métodos desta invenção, as proteínas GP5 de um isolado do PRRSV Norte Americano desejado (Figura 5) ou de um isolado do PRRSV Europeu (Figura 6) são alinhadas com a proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 (cepa Norte Americana NVSL 97-7895). Utilizando a proteína GP5 da SEQ ID NO: 1 como um proteína de referência, um versado na técnica pode facilmente identificar os sítios de glicosilação ligada a N em qualquer proteína GP5 e então construir as variações da proteína GP5 hipoglicosiladas desta invenção. É assim evidente que o termo "correspondendo a (asparagina 34 e/ou asparagina 51) em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1" serve como um descritor do sítio de glicosilação ligada a N em qualquer proteína GP5.

A proteína GP5 hipoglicosilada pode ser obtida partindo de um isolado do PRRSV Norte Americano que inclui, mas não está limitado às SEQ ID NO: 1-13, um isolado do PRRSV Norte Americano que é pelo menos 85% idêntico em um nível de sequência de aminoácidos a uma sequência consenso do PRRSV Norte Americano tal como a SEQ ID NO: 14 ou de uma sequência consenso do PRRSV Norte Americano. A proteína GP5 hipoglicosilada pode também ser obtida partindo de isolados do PRRSV Europeu incluindo, mas não limitados à SEQ ID NO: 15, um isolado do PRRSV Euro-

peu que é pelo menos 85% idêntico em um nível de seqüência de aminoácidos a uma seqüência consenso do PRRSV Europeu tal como SEQ ID NO: 15 ou de uma seqüência consenso do PRRSV Europeu. Para a obtenção dos polinucleotídeos que codificam a variação de GP5 hipoglicosilada, os

5 polinucleotídeos de qualquer uma das fontes listadas anteriormente podem sofrer mutação através de técnicas padronizadas de mutagênese direcionada ao sítio de forma que codificarão um polipeptídeo variante de GP5 hipoglicosilado. Alternativamente, pode ser construída uma seqüência de DNA inteiramente sintética que codifica o polipeptídeo variante de GP5 hipoglicosilado desejado. Isto é tipicamente realizado através da utilização de um

10 programa de análise de seqüências tal como "back translate" que converte uma seqüência de polipeptídeo em uma seqüência de polinucleotídeo correspondente (GCG Wisconsin Package™, Accelrys, Inc, San Diego, CA). Se desejado, o "codon bias" adequado pode ser incorporado no programa "back

15 translate" para fornecer o planejamento de um gene sintético que incorpora códons apropriados para uso no hospedeiro de expressão (isto é, mamífero ou levedura). [0074] O sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está presente em todos os isolados representativos do PRRSV Norte Americano mostrados na Figura 5 e na cepa representativa do PRRSV Europeu Lelystad (Fi-

20 gura 6). Nestes exemplos e não-limitantes de cepas do PRRSV Norte Americano e Europeu, o sítio de glicosilação ligada a N nesta posição compreende a seqüência "NGT". Entretanto, é previsto que outras variações do PRRSV podem compreender outros sítios de glicosilação ligada a N estruturalmente intercambiáveis (isto é, NXS ou T) que poderiam ser inativados através dos métodos ensinados aqui. Este sítio de glicosilação ligada a N pode ser inativado através da substituição dos códons que codificam outros resí-

25 duos de aminoácidos tal como glutamina ou alanina pela asparagina 51 na seqüência de polinucleotídeo correspondente. Nestes casos, a seqüência de aminoácidos correspondente na variação de proteína GP5 do PRRSV Norte

30 Americano hipoglicosilada compreenderia as seqüências tal como "QGT", "AGT" ou "XGT", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina.

Estas e outras variações hipoglicosiladas dos isolados da proteína GP5 do PRRSV Norte Americano em que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 está inativado também podem ser combinadas com outras variações de GP5 hipoglicosiladas em que outros sítios de glicosilação ligada a N estão inativados. Outros métodos de inativação de sítios de glicosilação ligada a N incluem substituições de aminoácidos dos resíduos "X" ou "S/T" da sequência NXS/T, deleções de aminoácidos ou inserções de aminoácidos e são descritos anteriormente.

O sítio de glicosilação ligada a N correspondendo extatamente à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está presente em apenas certos isolados representativos do PRRSV Norte Americano mostrados aqui (Figura 5). Mais especificamente, as proteínas GP5 dos isolados representativos do PRRSV Norte Americano IAF-BAJ (SEQ ID NO: 3), 94-3182 (SEQ ID NO: 7) e 94-287 (SEQ ID NO: 8) contêm o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo exatamente à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 e compreendem o sítio de glicosilação ligada a N "NSS". É evidentemente previsto que outros isolados de GP5 do PRRSV não-mostrados aqui conterão também os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 e que as variações hipoglicosiladas destas outras proteínas GP5 podem também ser obtidas utilizando os métodos descritos aqui. Este sítio de glicosilação ligado a N das SEQ ID NO: 3, 7 e 8 ou de outros isolados do PRRSV contendo o sítio de glicosilação ligada a N da asparagina 34 pode ser também inativado através da substituição dos códons que codificam outros resíduos de aminoácidos tal como glutamina ou alanina pela asparagina 34 na sequência de polinucleotídeo correspondente. Nestes casos em que o sítio de glicosilação ligada a N na asparagina 34 é "NSS", a sequência de aminoácidos correspondente na variação de proteína GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada compreenderia as sequências tal como "QSS", "ASS" ou "XSS", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina. Alternativamente, o resíduo de serina da sequência "NSS" pode ser substituído por um aminoácido sem ser hidróxi (isto é, sem ser serina ou

sem ser treonina). Nestes casos, a seqüência de aminoácido correspondente na variação de proteína GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada compreenderia a seqüência "NSX", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina. Uma inserção de um aminoácido sem ser hidróxi entre
 5 dois resíduos de serina da seqüência "NSS" (isto é, entre as serinas 35 e 36) também pode ser utilizada para inativar este sítio de glicosilação particular.

Nos outros isolados do PRRSV Norte Americano a ausência do sítio de glicosilação ligada a N correspondendo exatamente à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1, outros sítios de glicosilação
 10 ligada a N localizados no resíduo 30 (Figura 5 "NAS" nas SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13) e no resíduo 33 (Figura 5 "NNS" nas SEQ ID NO: 3, 8; "NSS" nas SEQ ID NO: 6, 10, "NDS" na SEQ ID NO: 11, 13) pode estar inativados. Em outras palavras, os sítios de glicosilação ligada a N em outros isolados Norte Americanos localizados nas posições de aminoácidos correspondendo aos resíduos 30 e 33 da proteína GP5 de referência da SEQ ID
 15 NO: 1 podem também estar inativados e ser utilizados nos métodos desta invenção. Sem ficar limitado à teoria, a região particular da proteína GP5 do PRRSV localizada entre os resíduos 29 e 35 da proteína de referência GP5 da SEQ ID NO: 1 parece ser uma região hipervariável (Figura 5) que pode
 20 tolerar uma variedade de seqüências de aminoácidos distintas (Figura 5; ver também Pirzadeh e outros, Can. J. Vet Res., 1998, 62: 170-177). Embora certos isolados do PRRSV que ocorrem naturalmente não contenham sítios de glicosilação ligada a N nesta região (isto é, isolados Norte Americanos das SEQ ID NO: 5, 12; isolado Europeu da SEQ ID NO: 15), outros isolados
 25 podem conter entre 1 até 3 sítios de glicosilação nesta região. Conseqüentemente, a inativação de qualquer um dos sítios de glicosilação de uma certa proteína GP5 na região localizada entre os resíduos 29 e 35 da proteína de referência GP5 da SEQ ID NO: 1 é considerada aqui como uma composição ou um método para a ativação de uma resposta imunológica melhorada para
 30 a proteína GP5 do PRRSV. Além disso, a inativação de mais de um ou de todos os sítios de glicosilação de uma certa proteína GP5 na região localizada entre os resíduos 29 e 35 da proteína de referência GP5 da SEQ ID NO:

1 é também considerada aqui como uma composição ou um método para a ativação de uma resposta imunológica melhorada para a proteína GP5 do PRRSV.

O alinhamento da sequência do PRRSV Norte Americano e Europeu mostra que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 também está presente em um isolado representativo do PRRSV Europeu. Neste caso particular, o sítio de glicosilação ligada a N compreende a sequência "NGT" e a asparagina 51 da sequência de referência da SEQ ID NO: 1 corresponde à asparagina 53 da SEQ ID NO: 15. Este sítio de glicosilação ligada a N pode ser inativado através da substituição dos códons que codificam outros resíduos de aminoácidos tal como a glutamina ou a alanina pela asparagina 53 na sequência de polinucleotídeo do PRRSV Europeu correspondente. Nestes casos, a sequência de aminoácidos correspondente na variação da proteína GP5 do PRRSV Europeu hipoglicosilada compreenderia as sequências tal como "QGT", "AGT" ou "XGT", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina. Estas ou outras variações hipoglicosiladas dos isolados do PRRSV Europeu em que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 está inativado podem também ser combinadas com outras variações de GP5 hipoglicosiladas em que outros sítios de glicosilação ligada a N estão inativados.

As proteínas variantes GP5 hipoglicosiladas podem ser codificadas por vírus PRRS que podem ser utilizados para preparar vacinas vivas, mortas ou atenuadas para a proteção de porcos das infecções causadas pelo PRRSV. Em modalidades preferidas da invenção, as proteínas variantes GP5 hipoglicosiladas desta invenção são engenheiradas em clones de PRRSV infecciosos que são capazes de produzir RNA infeccioso do PRRSV. As descrições de clones infecciosos do PRRSV Norte Americano que poderiam ser engenheirados para codificar as proteínas variantes GP5 hipoglicosiladas são encontradas na Patente U.S. Nº 6.500.662, Nielsen e outros, J. Virol. 77: 3702-11, 2003 e Truong e outros, Virology 325: 308-19, 2004. As sequências de clones infecciosos do PRRSV Norte Americano que

podem ser submetidas à mutagênese para a obtenção de vírus PRRSV para uso em vacinas incluem, mas não estão limitadas às cepas Norte Americanas NVSL 97-7895 (SEQ ID NO: 16) e à cepa VR-2332 (SEQ ID NO: 17). As descrições de clones infecciosos do PRRSV Europeu que poderiam ser engenheirados para codificar as proteínas variantes GP5 hipoglicosiladas são encontradas na Patente U.S. Nº 6.268.199. Em modalidades em que a vacina compreende um PRRSV vivo ou atenuado, o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo a N44 na proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 (isto é, a sequência "NLT" nas Figuras 5 e 6) não está inativado uma vez que a glicosilação deste sítio é necessária para a capacidade de infecção do PRRSV. No caso dos isolados do PRRSV Europeu, o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo a N44 na proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 é a sequência NLT que começa na asparagina 46 da cepa representativa do PRRSV Europeu Lelystad (SEQ ID NO: 15; Figura 6). O sítio de glicosilação ligada a N de N46 das cepas do PRRSV Europeu é também necessário para a capacidade de infecção e não é inativado em modalidades da invenção em que uma vacina viva ou atenuada de PRRSV é utilizada.

Alternativamente, as proteínas variantes GP5 hipoglicosiladas podem ser introduzidas nos porcos com vacinas de DNA. Tais vacinas de DNA compreendem tipicamente uma molécula de DNA em que um promotor ativo em células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica a dita variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada. Os promotores que podem ser utilizados para controlar a expressão das proteínas variantes GP5 hipoglicosiladas incluem, mas não estão limitados ao promotor inicial imediato do CMV (citomegalovírus), ao promotor de repetição terminal longa do RSV (vírus do sarcoma de Rous) e ao promotor do antígeno T do SV40 (Vírus de Símios 40). Em certas modalidades preferidas, este promotor é um promotor do CMV.

Ainda em outras modalidades, o polinucleotídeo isolado que expressa a proteína variante GP5 hipoglicosilada compreende um vetor viral sem ser o PRRSV. Os vetores virais sem ser o PRRSV incluem, mas não estão limitados aos vetores do vírus vaccinia, aos vetores virais de herpes

simplex, aos vetores de adenovírus, aos vetores de alfavírus e aos vetores de TGEV. Tais vetores são descritos em várias publicações tais como as Patentes U.S. Nºs 7.041.300 (para vetores de TGEV) e 6.692.750 (para vetores de alfavírus).

5 Veículos e adjuvantes terapeuticamente aceitáveis

Na prática da invenção, os polipeptídeos da variação de GP5 hipoglicosilada ou os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos da variação de GP5 hipoglicosilada podem ser combinados com veículos ou excipientes terapeuticamente aceitáveis. Os exemplos não-limitantes de tais veículos incluem solução salina fisiológica ou outras soluções salinas similares, proteínas tais como as proteínas da albumina do soro, tampões tais como tampões à base de carbonato, fosfato, fosfonato ou Tris, tensoativos tal como NP40 ou Triton X100 e polímeros de polietileno glicol. Qualquer combinação de tais veículos pode ser utilizada nas composições e nos métodos desta invenção. Um veículo preferido para as composições que compreendem vírus PRRSV vivos ou atenuados é o acetato de dl- α -tocoferol em uma concentração entre 50 até 100 mg/mL.

O uso de adjuvantes nas composições que contêm os polipeptídeos da variação de GP5 hipoglicosilada ou os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos da variação de GP5 hipoglicosilada também é considerado. Tais adjuvantes tipicamente têm natureza aquosa ou oleosa. Os adjuvantes que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados ao hidróxido de alumínio, ao Quil A, a uma interrupção brusca em gel de alumina, aos óleos minerais, aos glicerídeos, aos ácidos graxos, aos subprodutos de ácidos graxos, às micobactérias e aos oligodesoxinucleotídeos CpG ou qualquer combinação dos mesmos. Vários tipos de adjuvantes de CpG que podem ser utilizados são descritos nas Patentes U.S. Nºs 6.977.245 e 6.406.705.

O uso de outros adjuvantes que potencializam respostas imunológicas celulares (isto é, potenciadores de subpopulações de células T helper (Th.sub.1 e Th.sub.2)) também é considerado. Tais adjuvantes incluem, mas não estão limitados a interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL4, IL-5, IL6, IL-12, in-

terferon gama (g-IFN), fator de necrose celular, MDP (muramil dipeptídeo), complexo imuno estimulante (ISCOM) e lipossomos.

A administração da composição pode ser realizada através de injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeção intradermal, injeção parenteral, injeção intramuscular, injeção isenta de agulha, eletroporação, fornecimento oral, fornecimento intranasal, fornecimento oronasal ou qualquer combinação dos mesmos. A injeção isenta de agulha é tipicamente realizada com um dispositivo tal como um injetor Agro-Jet® injector (Medical International Technologies, Montreal, Canadá).

10 Exemplos

Exemplo 1.

O exemplo a seguir ilustra a construção de vários polinucleotídeos do PRRSV que codificam várias variações do polipeptídeo GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosiladas, composições que incluem tais polinucleotídeos que são utilizados para ativar respostas imunológicas melhoradas para um antígeno do PRRSV e métodos de utilização dos polinucleotídeos e das composições para a ativação de uma resposta imunológica melhorada em um porco para um antígeno do PRRSV.

MATERIAIS E MÉTODOS

20 Células, meios e anticorpos. As células MARC-145 foram propagadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 unidades de penicilina, 20 unidades de estreptomicina e 20 unidades de canamicina por mL de meio de cultivo. Estas células foram utilizadas para a eletroporação do RNA, a infecção viral, o
25 crescimento viral e os ensaios de placas. As células renais de hamster bebê (BHK-21) foram mantidas em Meio Mínimo Essencial (MEM) com sal de Earl contendo 5% de PBS e os antibióticos mencionados anteriormente. As células BHK-21 foram utilizadas para a expressão transitória de GP5 seguida por ensaios de imunofluorescência (IFA) ou experimentos de marcação radioativa e de imunoprecipitação. Todas as células foram mantidas a 37°C e ambiente de 5% de CO₂. Os anticorpos monoclonais de coelho para as proteínas GP5 e M do PRRSV foram gentilmente fornecidos por Carl A. Gagnon (Uni-
30

versity of Quebec, Montreal, Canadá). O anticorpo monoclonal (SDOW17) contra a proteína do nucleocapsídeo (N) foi obtido nos National Veterinary Services Laboratories (NVSL, Ames, IA, USA). O Alexa-488 anticamundongo foi obtido na Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA).

5 Manipulação genética dos plasmídeos que codificam GP5 e o clone infeccioso do PRRSV

O clone de cDNA infeccioso do PRRSV de comprimento completo (FL12; SEQ ID NO: 16) em pBR322 foi digerido com as enzimas de restrição EcoRV e BstZ17 I e o fragmento de ~4,9 kpb abrangendo a maior parte do ORF2, o ORF3-7 completo e a UTR a 3' inteira do PRRSV foi clonado em pBR322 utilizando os mesmos sítios de enzimas. Este plasmídeo intermediário serviu como o molde para a mutagênese para a introdução de mutações nos sítios de glicosilação ligada a N potenciais (N34, N44 e N51) dentro de GP5 (Fig. 2). A mutagênese foi realizada utilizando a PCR de extensão de sobreposição com iniciadores sintéticos (Tabela 2) utilizando técnicas padronizadas.

Iniciadores	Seqüências de nucleotídeos	
GP5-N34A-For	5' GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTC 3' (SEQ ID NO:18)	
GP5-N44A-For	5' GTTGATTACGCCTTGACGCTATG 3' (SEQ ID NO:19)	
GP5-N51A-For	5' GTGAGCTGGCTGGCACAGATTG 3' (SEQ ID NO:20)	
GP5-N34/44A-For	5' GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTCATCTTCAGTTGATTACGCCTTGACGCTATG 3' (SEQ ID NO:21)	
GP5-N44/51A-For	5' GTTGATTACGCCTTGACGCTATGTGAGCTGGCTGGCACAGATTG 3' (SEQ ID NO:22)	
GP5-N34/51A-For	5' GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTCATCTTCAGTTGATTACAACTGACGCTATG TGAGCTGGCTGGCACAGATTG 3' (SEQ ID NO:23)	
GP5-N34/44/51A-For	5' GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTCATCTTCAGTTGATTACGCCTTGACGCTATG TGAGCTGGCTGGCACAGATTG 3' (SEQ ID NO:24)	
PRRSV-13177-For	5' CTACCAACATCAGGTCGATGGCGG 3' (SEQ ID NO:25)	
PRRSV-14473-Rev	5' GTCGGCCGCGACTTACCTTTAGAG 3' (SEQ ID NO:26)	

Tabela 2. Iniciadores e suas seqüências utilizadas neste estudo. As seqüências dos códons sublinhadas indicam o sítio da mutação.

O produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição Bs-

rG I e BstE II e colocado de volta no plasmídeo intermediário. Os clones contendo as mutações desejadas foram identificados e confirmados por seqüenciamento. A região codificadora inteira de GP5 foi seqüenciada para assegurar que mutações adicionais não estavam presentes nos clones. O
5 fragmento EcoRV-Pac I do plasmídeo intermediário contendo mutações na região codificadora de GP5 foi transferido de volta para o clone de cDNA de comprimento completo utilizando os mesmos sítios das enzimas de restrição. A região codificadora de GP5 nos clones de comprimento completo foi novamente seqüenciada com iniciadores internos específicos do PRRSV
10 para confirmar a presença das mutações.

O GP5 do tipo selvagem e os mutantes individuais foram clonados em um vetor bicistrônico em que o GP5 é o primeiro cístron seguido pelo sítio de entrada interna de ribossomos (IRES) do vírus da encefalomiocardite (EMCV) e as seqüências codificadoras de M (Fig. 1A). O GP5 de comprimento completo também foi clonado no vetor controlado pelo promotor do
15 CMV (pcDNA 3.0™, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) para estudos de complementação. Para esta finalidade, a região codificadora de GP5 foi amplificada pela PCR, clonada e seqüenciada.

Transcrição e eletroporação *in vitro*

20 Os plasmídeos de comprimento completo foram digeridos com AclI e o DNA linearizado foi utilizado como o molde para gerar produtos da transcrição do RNA com cap utilizando o kit mMESSAGE mMACHINE Ultra T7™ seguindo as recomendações do fabricante (Ambion, Inc., Austin, Tx, USA) e como descrito anteriormente. A mistura de reação foi tratada com
25 DNaseI para digerir o molde de DNA e extraída com fenol e clorofórmio e finalmente precipitada com isopropanol. A integridade dos produtos da transcrição *in vitro* foi analisada através da eletroforese em gel de agarose glioxal seguida pela coloração com brometo de etídio.

As células MARC-145 foram submetidas à eletroporação com
30 aproximadamente 5,0 µg dos produtos da transcrição *in vitro* junto com 5,0 µg do RNA total isolado das células MARC-145. Aproximadamente 2×10^6 células em 400 µL de DMEM contendo 1,25% de DMSO foram submetidas a

pulsos uma vez utilizando o Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, USA) a 250V, 950µF em uma cubeta de 4,0 mm. As células foram diluídas em meio de cultivo normal, plaqueadas em uma placa de cultura de 60 mm. Uma pequena proporção das células eletroporadas foi plaqueada em uma placa de 24 cavidades para verificar a expressão da proteína N 48 h após a eletroporação, que indicaria a replicação do genoma e a transcrição. Uma vez que a expressão da proteína N é confirmada utilizando o ensaio de imunofluorescência indireto (IFA), o sobrenadante da massa das células eletroporadas na placa de 60 mm foi coletado 48 h após a eletroporação, clarificado e passado por células MARC-145 "naïve". As células infectadas foram observadas em relação ao efeito citopático (CPE) junto com a expressão da proteína N utilizando IFA. Os sobrenadantes das células infectadas exibindo tanto CPE quanto fluorescência positiva foram considerados como contendo vírus infeccioso. Após a confirmação, o estoque de vírus foi crescido e congelado a -80°C em pequenas alíquotas para estudos adicionais. Em todos os experimentos, o genoma do PRRSV do tipo selvagem contendo FL12 e o genoma do PRRSV defeituoso em relação à polimerase contendo FL12pol foram utilizados como controles.

Marcação radioativa metabólica e análises das proteínas

As células BHK-21 em placas de seis cavidades foram infectadas com o vírus vaccinia recombinante (vTF7-3) em uma MOI de 3,0 e subsequentemente transfectadas com o DNA do plasmídeo bicistrônico que codifica GP5 do tipo selvagem ou vários mutantes sob o promotor da RNA polimerase de T7. A transfecção do DNA foi realizada utilizando Lipofectamine2000™ seguindo o protocolo do fabricante (Life Technologies, USA). 16 h após a transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas sob estarvação em DMEM isento de metionina/cisteína durante uma h e marcadas radioativamente com 0,6 mL de DMEM isento de metionina/cisteína contendo 100 µCi de Expre³⁵S ³⁵S Protein Labeling Mix (NEN Life Sciences, Boston, MA) por mL de meio durante três horas. Após a marcação radioativa, as células foram lavadas em PBS gelado três vezes e os extratos celulares foram preparados em 300 µL de tampão de ensaio de ra-

dioimunoprecipitação (RIPA) (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, 1% de desoxicolato de sódio e 1x inibidor de protease). Os extratos celulares clarificados foram incubados durante a noite a 40°C com anticorpo anti-GP5 ou anti-proteína M de coelho. Uma interrupção brusca de aproximadamente 4,0 mg de proteína A sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suécia) em 100 µL de tampão de RIPA foi adicionada e incubada adicionalmente durante 2 h. Os complexos imunoprecipitados foram lavados 3 vezes com 500 µL de tampão de RIPA e utilizados para análises adicionais.

10 Para o tratamento com a endoglicosidase H (Endo H), os complexos imunoprecipitados foram ressuspensos em 20 µL de tampão de desnaturação 1x (0,5% de SDS, 1,0% de β-mercaptoetanol) e fervidos durante 10 min. O sobrenadante foi coletado, ajustado ao tampão G5 1x (0,05 M de citrato de sódio pH 5,5) e incubado durante 16 h a 37°C com 100 unidades de Endo H (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). As amostras de controle não digeridas foram processadas similarmente, mas a Endo H não foi adicionada. Após a digestão com a Endo H, as amostras foram misturadas com um volume equivalente de tampão de amostra de SDS-PAGE 2x, fervidas durante 5 min e resolvidas por PAGE com 12% de SDS sob condições desnatuantes junto com o marcador de proteína (Protein Plus Precision Standard, Bio-Rad, Inc). O gel foi fixado com 10% de ácido acético durante 15 min, lavado três vezes com água, tratado com 0,5 M de salicilato de sódio durante 30 min, seco e finalmente exposto ao filme de raio X a -70°C. Para a digestão de peptídeos com N-Glicosidase F (PNGase F) (New England Biolabs, Inc), os complexos imunoprecipitados foram suspensos em tampão G7 1x (0,05 M de fosfato de sódio pH 7,5, 1,0% de NP-40) e a digestão foi realizada através da incubação durante 16 h a 37°C com 2 unidades da enzima. Para verificar a síntese de GP5 na presença de tunicamicina (Sigma, St. Louis, MO), as células transfectadas foram tratadas com 2,0 µg de tunicamicina por mL de meio durante uma hora e a marcação radioativa foi realizada na presença do fármaco durante 3 h como anteriormente.

Para a obtenção de GP5 radiorrotulada expressa por virions ex-

tracelulares ou por vírus intracelulares, as células MARC-145 foram infectadas com PRRSVs do tipo selvagem ou mutantes. 48 horas após a infecção, as células foram mantidas em jejum durante uma hora e radiorrotuladas com 100 μ Ci de Expre³⁵S ³⁵S Protein Labeling Mix por mL de meio contendo 90% de DMEM isento de metionina/cisteína e 10% de DMEM regular durante 24 h. Após a marcação, o sobrenadante de cultura foi coletado, clarificado em relação aos restos celulares e os virions extracelulares foram peletizados a 100.000x g durante 3 h a 4°C. As pelotas virais foram ressuspensas em 200 μ L de tampão de RIPA, imunoprecipitadas com o anticorpo anti-GP5 e as proteínas foram verificadas com ou sem o tratamento com a Endo H. Para a imunoprecipitação da GP5 expressa por vírus intracelulares, a infecção foi realizada como anteriormente e 24 h após a infecção, as células foram submetidas ao jejum durante uma hora, radiorrotuladas como anteriormente durante 2 h antes da preparação dos extratos celulares.

15 Cinética de crescimento viral e ensaio de placas

As células MARC-145 foram infectadas com PRRSV mutante ou do tipo selvagem a uma MOI de 3,0 UFP por célula e incubadas a 37°C em uma incubadora. Em vários pontos de tempo após a infecção, foram coletadas alíquotas dos sobrenadantes de cultura das células infectadas e o título viral nos sobrenadantes foi determinado e expresso por 50% da dose infecciosa na cultura de tecido por mL (TCID₅₀/mL). A cinética do crescimento viral foi realizada três vezes. Para verificar a morfologia das placas dos vírus mutantes, o ensaio de placas foi realizado utilizando células MARC-145. As células foram infectadas com diluições em série de 10 vezes de vírus individuais durante uma hora a 37°C. A monocamada de células infectadas foi lavada com PBS e coberta com DMEM-5% de FBS contendo 0,8% de agarose Seaplaque (FMC Bioproducts, Rockland, ME USA). Após 96 h, os plugues de agarose foram removidos e a monocamada de células foi incubada com solução de coloração (20% de Formaldeído 9,0% de Etanol e 0,1% de Cristal violeta) durante 30 min à temperatura ambiente. As células foram gentilmente lavadas com água para remover o excesso de corante e secas ao ar para verificar e contar as placas.

Complementação da recuperação do vírus através da expressão da GP5 do tipo selvagem em trans

As células BHK-21 foram transfectadas com pcDNA-GP5. 40 h após a transfecção, as células foram coletadas e submetidas à eletroporação com produtos da transcrição *in vitro* com cap derivados do cDNA de PRRSV de comprimento completo que codifica a GP5 mutante. As células submetidas à eletroporação foram diluídas com meio fresco e plaqueadas em uma placa de 6 cavidades. O sobrenadante das células eletroporadas foi coletado 48 h após a eletroporação, centrifugado para remover os restos celulares e utilizado para infectar células MARC-145 "naïve". As células MARC-145 infectadas foram verificadas 48 h após a infecção em relação à expressão da proteína N por IFA como descrito anteriormente. O número de células positivas foi contado para determinar o número de pseudopartículas produzidas no sobrenadante. O número médio de células positivas foi calculado partindo de três experimentos independentes e foi apresentado na forma do número de pseudopartículas produzidas por micrograma do RNA transcrito *in vitro* transfectado nas células.

Ensaio de neutralização do soro (SN)

O título dos anticorpos neutralizadores de PRRSV em uma amostra de soro foi determinado utilizando o ensaio de neutralização com focalização fluorescente descrito anteriormente. As diluições em série dos soros de teste foram incubadas durante 60 min a 37°C na presença de 200 TCID₅₀ do vírus de desafio, que consistia em FL12 (PRRSV do tipo selvagem) ou qualquer um dos vírus que codificam a GP5 mutante, FL-N34A, FL-N51A e FL-N34/51A em meio de Eagle modificado por Dulbecco contendo 5% de soro fetal de bezerro. As misturas foram adicionadas a placas para microtitulação de 96 cavidades contendo células MARC-145 confluentes que foram semeadas 48 h antes. Após a incubação durante 24 h a 37°C em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, as células foram fixadas durante 10 min com uma solução de 50% de metanol e 50% de acetona. Após lavagem vigorosa com PBS, a expressão da proteína N do PRRSV foi detectada com o anticorpo monoclonal SDOW17 utilizando uma diluição de 1:500, se-

guido pela incubação com IgG anticamundongo de cabra conjugada com FITC (Sigma, St.Louis, MO, USA) a uma diluição de 1:100. Os títulos de neutralização foram expressos como o coeficiente recíproco da maior diluição que inibia 90% dos focos presentes nos poços de controle.

5 Inoculação experimental de porcos com mutantes de GP5 e PRRSV do tipo selvagem

Os estoques com títulos altos (obtidos através de 3 passagens em células MARC 145) dos vírus mutantes de GP5 (FL-N34A, FL-N51A e FL-N34/51A) e o FL12 (PRRSV do tipo selvagem) foram utilizados para infectar porcos jovens. Porcos recentemente desmamados de vinte um dias de idade foram obtidos de um rebanho isento de agentes patogênicos específicos com um registro certificado de ausência de infecção pelo PRRSV. Todos os animais eram negativos em relação a anticorpos anti-PRRSV o que foi testado por ELISA (Iddex Labs, Portland, ME). Três porcos por grupo foram infectados com PRRSV do tipo selvagem FL12 ou FL-N34A, FL-N51A e FL-N34/51A mutantes. Em todos os casos, o inóculo consistia em 10⁵ TICD50 diluídos em 2 mL e administrado de forma intramuscular no pescoço. As temperaturas retais dos animais inoculados foram monitoradas durante 15 dias após a inoculação (PI). A viremia foi medida através do isolamento regular em células MARC 145 nos dias 4, 7 e 14 PI. As amostras de soro foram retiradas semanalmente durante um período total de 49 dias PI. As amostras de soro foram utilizadas para a detecção de títulos de neutralização cruzada homólogos e heterólogos para cada um dos PRRSVs mutantes ou do tipo selvagem.

25 RESULTADOS

Expressão e caracterização de GP5 do PRRSV

O GP5 da cepa do PRRSV 97-7895 possui três supostos sítios de glicosilação (N34, N44 e N51). Para verificar o padrão de glicosilação de GP5, foi primeiramente gerado um vetor bicistrônico em que as regiões codificadoras das proteínas GP5 e M que flanqueiam o IRES do EMCV foram colocadas sob o controle do promotor da RNA polimerase de T7 (Figura 1A). A base lógica para a construção do vetor bicistrônico é que as proteínas

GP5 e M são conhecidas (para LDV e EAV) ou postuladas (para PRRSV) como interagindo uma com a outra e que tais interações podem ser importantes para o dobramento da proteína, a glicosilação, o transporte intracelular e/ou outra atividade biológica de GP5.

5 A expressão transitória de GP5 e M através da transfecção do plasmídeo bicistrônico seguida pela marcação radioativa e a imunoprecipitação com o anticorpo anti-GP5 revelou duas espécies de proteínas principais. As espécies de proteínas que migram com uma massa de ~25,5 kDa são a forma totalmente glicosilada de GP5 (Figura 1B, faixa 2). Uma vez que cada
10 glicosilação ligada a N adiciona ~2,5 kDa de massa molecular a uma proteína, isto indica que todos os três sítios de glicosilação potenciais são possivelmente utilizados para a glicosilação de GP5. A espécie de proteína de 19,0 kDa é a proteína M viral uma vez que era imunoprecipitada apenas com o anticorpo anti-M (faixa 7). Os resultados indicam que as proteínas GP5 e
15 M interagem uma com a outra nas células que expressam ambas as proteínas. Após o tratamento com a Endo H, uma enzima que remove cadeias de oligossacarídeos do tipo com alto teor de manose, o tamanho da GP5 foi reduzida para ~18 kDa, enquanto que o tamanho da proteína M permanecia inalterado (faixa 3). O tratamento de GP5 com a PNGase F (faixa 4), uma
20 enzima que remove todos os tipos de açúcares da estrutura da proteína ou a síntese da GP5 na presença de tunicamicina (faixa 5) resultou em uma proteína que migrou com mobilidade eletroforética ligeiramente maior que a proteína com tratamento com a Endo-H. Isto é esperado uma vez que o tratamento com a tunicamicina ou a digestão com a PNGase F geraria proteínas não-glicosiladas enquanto que o tratamento com a Endo-H resultaria em proteínas que mantêm os resíduos de N-acetilglucosamina em cada um dos
25 sítios de glicosilação ligada a N. Deve-se observar que uma espécie de proteína notória de massa molecular de ~30 kDa foi imunoprecipitada com o anticorpo anti-M. A identidade desta proteína não é conhecida, mas poderia
30 ser uma proteína celular que interage com a proteína M.

Os resultados dos estudos anteriores sugerem que as formas não-glicosiladas e totalmente glicosiladas de GP5 possuem tamanhos mole-

culares aparentes de 18,0 kDa e 25,5 kDa, respectivamente. Parece que todos os três sítios de glicosilação potenciais são utilizados para gerar a forma totalmente glicosilada de GP5. As porções de glicano adicionados a estes sítios são do tipo de alto conteúdo de manose uma vez que são sensíveis à digestão pela Endo H. Em adição, os resultados indicam que ambas as formas não glicosiladas e totalmente glicosiladas de GP5 parecem interagir com a proteína M.

Análise dos sítios de glicosilação ligada a N utilizados para a glicosilação de GP5

Para determinar mais precisamente se todos ou alguns dos sítios de glicosilação ligada a N potenciais na GP5 são utilizados para a adição de grupamentos de açúcar, foi gerada uma série de mutantes no plasmídeo bicistrônico em que todos os três sítios de glicosilação potenciais N34, N44 e N51 (Figura 2A) foram alterados para alaninas individualmente ou em várias combinações (Figura 2B). Em células transfectadas com plasmídeo, as proteínas foram radiorrotuladas e imunoprecipitadas com o anticorpo anti-GP5. Os complexos imunológicos foram deixados não tratados ou foram tratados com a Endo H e verificados por SDS-PAGE. Como pode ser visto partindo dos dados apresentados na Figura 2C, as proteínas GP5 mutantes que carregam mutações isoladas (N34A, N44A ou N51A) migraram como as espécies de proteínas de aproximadamente 23,0 kDa (faixas 4, 6 e 8, ponta de seta). Após o tratamento com a Endo H, estas proteínas migraram como as espécies de proteínas de ~18,0 kDa (faixas 5, 7 e 9, respectivamente) similares à GP5 do tipo selvagem após o tratamento com a Endo H (faixa 3). As diferenças menos importantes na mobilidade eletroforética das proteínas é mais provavelmente um reflexo do fato de que a proteína do tipo selvagem manteria todos os três resíduos de N-acetilglucosamina após o tratamento com a Endo H quando comparada com os mutantes isolados que conteriam dois tais resíduos. Os duplo mutantes (N34/44A, N44/51A e N34/51A) produziram espécies de proteínas que migraram próximas à proteína de ~20,5 kDa (faixas 10, 12 e 14) e após o tratamento com a Endo H, o tamanho das proteínas foi reduzido para 18,0 kDa (faixas 11, 13 e 15). O

triplo mutante (N34/44/51A) gerou uma proteína que migrou como a proteína de 18,0 kDa (faixa 16) e era resistente à digestão com a Endo H (faixa 17).

Assim, partindo dos estudos de mutação anteriores, é evidente que todos os três sítios de glicosilação potenciais sejam utilizados para a glicosilação para gerar a GP5 do PRRSV totalmente madura. Parece que todos os três sítios de glicosilação são modificados por porções de glicano do tipo com alto conteúdo de manose.

Recuperação do vírus PRRSV infeccioso com mutantes de GP5

Para avaliar a importância da glicosilação ligada a N na produção de PRRSV infeccioso, as regiões codificadoras das proteínas GP5 mutantes foram inseridas no clone de cDNA de comprimento completo. Os produtos da transcrição *in vitro* com cap produzidos partindo dos clones foram submetidos à eletroporação em células MARC-145 e foi verificada a produção de PRRSV infeccioso. Os resultados dos presentes inventores mostraram que o vírus infeccioso era facilmente recuperado das células eletroporadas com produtos da transcrição de comprimento completo contendo mutações em N34, N51 e N34/51. Entretanto, sob condições similares de recuperação do vírus, tentativas repetidas de recuperação de outros vírus mutantes não foram bem-sucedidas. Embora a cinética de crescimento dos vírus recuperados fosse similar àquela do vírus do tipo selvagem, o rendimento total dos vírus FL-N34A e FL-N51A contendo mutações em N34 e N51 era de aproximadamente um log menor nas células MARC-145 enquanto que do FL-N34/51A com duplas mutações (N34/51A) era quase 1,5 log menor que o do PRRSV do tipo selvagem (Fig. 3A). A amplificação por RT-PCR do RNA de células infectadas seguida pelo seqüenciamento de nucleotídeos indicava que estes vírus são estáveis, continham as mutações desejadas e nenhuma outra mutação foi detectada na região de GP5 inteira (dados não mostrados).

O ensaio de placas virais foi realizado em células MARC-145 para monitorar o fenotipo de placas de vírus mutantes. As placas geradas pelo PRRSV do tipo selvagem eram claras e distintas enquanto que os vírus mutantes produziam placas que tinham fenotipos diferentes. Os vírus FL-

N34A, FL-N51A e FL-N34/51A geravam placas que eram menos distintas e muitas das células dentro da placa pareciam normais (Figura 3B, seta aberta). Em adição, FL-N51A, FL-N34/51A produziam algumas placas em que os vírus falhavam em clarear a monocamada de células (Figura 3B, seta preenchida). Estes dados indicam que os vírus mutantes recuperados são na verdade menos citopáticos quando comparados com o PRRSV do tipo selvagem.

Uma vez que não era possível recuperar PRRSV infeccioso com os moldes mutantes FL-N44A, FL-N31/44A, FL-N44/51A e FL-N31/44/51A, é possível que mutações na região codificadora de GP5 possam ter afetado algumas outras funções dos moldes de RNA, tal como o empacotamento do RNA genômico dentro de partículas. Para investigar isso, foi verificado quais células expressando a GP5 do tipo selvagem em trans poderia sustentar o empacotamento de moldes de RNA mutantes que são de outra maneira defeituosos na produção de PRRSV infeccioso. As células BHK-21 transfectadas com pcDNA-GP5 foram submetidas à eletroporação com produtos da transcrição *in vitro* e 48 h após a eletroporação, os sobrenadantes de cultura foram coletados e utilizados para infectar células MARC-145 "naïve" para determinar a produção de pseudopartículas de PRRSV. Se as pseudopartículas fossem geradas, seria esperada a observação da expressão da proteína N no caso de células MARC-145 infectadas. A expressão de N é possível apenas quando células MARC-145 "naïve" recebem o genoma de RNA mutante encapsulado de comprimento completo que inicia a replicação após a entrada das pseudopartículas nas células. De todos os mutantes que não podiam ser recuperados anteriormente, foi possível recuperar pseudopartículas contendo dois genomas mutantes de comprimento completo (FL-N44A e FL-N34/44A) (Figura 3C). Cada célula com fluorescência verde na cultura infectada com o vírus mutante representa uma pseudopartícula infecciosa. Uma vez que estas partículas contêm apenas a GP5 do tipo selvagem funcional no envelope, mas contêm as seqüências codificadoras para a GP5 mutante não funcionais no genoma, não podem produzir partículas infecciosas para o espalhamento para as células circundantes. Várias tentativas pa-

ra a recuperação de partículas pseudoinfecciosas com outros moldes mutantes (FL-N44/51A e FL-N31/44/51A) não foram bem sucedidas.

Uma estimativa quantitativa do número de pseudopartículas infecciosas produzidas partindo destes experimentos sugere que aproximadamente 1000 partículas são produzidas por micrograma de RNA mutante eletroporado nas células (Figura 3D). Isto é aproximadamente 100 vezes menos que o obtido com o RNA que codifica a GP5 do tipo selvagem. A produção de tais níveis baixos de pseudopartículas infecciosas poderia ser causada pelo fato de que apenas aproximadamente 5-10% das células que expressavam a GP5 do tipo selvagem receberam os produtos da transcrição de comprimento completo como é observado pela expressão da proteína N nestas células. É também possível que os níveis baixos de expressão da GP5 do tipo selvagem nas células transfectadas possam ter contribuído para os níveis baixos de produção destes pseudovirions.

15 Verificação da GP5 incorporada nos vírus mutantes e das expressas nas células infectadas

Para determinar a natureza da proteína GP5 incorporada nos virions infecciosos produzidos partindo de células transfectadas, foram gerados PRRSV radorrotulados partindo de células infectadas com os vírus do tipo selvagem e mutantes. Os virions extracelulares presentes no sobrenadante de cultura foram peletizados por ultracentrifugação e a GP5 presente nestes virions foram verificadas por imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-GP5 e a análise eletroforética subsequente. Os resultados mostram que a GP5 do tipo selvagem incorporada nos virions migrava na forma de uma banda amplamente difusa de uma espécie de proteína de ~25-27 kDa (Figura 4A, faixa 1), que é parcialmente resistente à digestão com a Endo H (faixa 2). A GP5 mutante (N34A e N51A) incorporada nos virions era sensível a endo H. Com base no tamanho dos produtos gerados após a digestão com a Endo H, parece que apenas uma porção de glicano nestes mutantes com um único sítio é sensível enquanto que o outro é resistente. Em contraste, a GP5 duplo mutante (N43/51A) era resistente a endo H. Além disso, a digestão com a Endo da GP5 de vírus mutantes também produziu quantidades

muito pequenas da estrutura da proteína GP5, indicando que estes vírus incorporam proteínas GP5 que contêm porções de glicano resistentes a endo H assim como sensíveis a endo H.

Uma vez que nas células transfectadas com o vetor bicistrônico,
5 as proteínas GP mutantes eram completamente sensíveis a endo H (Figuras 1 e 2), foi surpreendente a observação de que a GP5 nos virions de PRRS continham formas fortemente resistentes a endo H. Para verificar se as formas resistentes a endo H da proteína são também sintetizadas nas células infectadas, as células MARC-145 infectadas com o PRRSV do tipo selvagem
10 ou mutante foram radiorrotuladas, as proteínas GP foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-GP5 e analisadas por eletroforese com ou sem a digestão com a Endo H. Os resultados de tal experimento são mostrados na Figura 4B. A maior parte da GP5 do tipo selvagem continha glicanas resistentes a endo H em todos os três sítios (faixas 2 e 3), enquanto que os dois mutan-
15 tes isolados continham glicanas resistentes a endo H somente em um sítio (faixas 4-7). Alguns das porções de glicana no duplo mutante eram resistentes enquanto outros eram sensíveis a endo H (faixas 8 e 9). Embora o padrão de resistência a endo H seja similar ao que é observado para a GP5 associada ao virion, é diferente do que é observado nas células que expres-
20 sam ambas as proteínas GP5 e M (Figuras 1 e 2). Estes resultados indicam que outras proteínas virais podem desempenhar uma função na modificação adicional de glicanas na GP5. Influência da hipoglicosilação de GP5 sobre a capacidade dos PRRSVs de serem neutralizados por anticorpos específicos.

O nível de glicosilação de glicoproteínas virais que estão envol-
25 vidas na interação com receptores virais é conhecido por afetar a capacidade dos virions de reagirem com anticorpos neutralizadores de vírus. Para testar se este fenômeno ocorre no caso do PRRSV, os mutantes de GP5 do PRRSV com padrões de glicosilação alterados (FL-N34A, FL-N51A e FL-N34/51A) foram comparados com o PRRSV do tipo selvagem (FL12) em
30 relação a sua capacidade de serem neutralizados pelo anti-soro convalescente. Para isto, foram utilizados anti-soros convalescentes (47 dias p.i.) de 4 animais que foram infectados com o PRRSV do tipo selvagem. Doses simi-

lares (2.000 TCID₅₀) de mutantes de GP5 do PRRSV infecciosos (FL-N34A, FL-N51A e FL-N34/51A) assim como do PRRSV do tipo selvagem derivado do clone infeccioso (FL12) foram utilizadas como o vírus de desafio nos ensaios de neutralização do soro seguindo o protocolo de ensaio padronizado dos presentes inventores e o conjunto de 4 soros anti-PRRSV do tipo selvagem (FL12) utilizado como referência. A Tabela 3 mostra os títulos de neutralização do soro de ponto final obtidos. Normalmente, uma amostra de soro convalescente do PRRSV do tipo selvagem coletada 47-54 dias p.i. contém níveis moderados de atividade de neutralização do PRRSV do tipo selvagem (1:8 até 1:32, Tabelas 3 e 4), refletindo a qualidade relativamente fraca e tardia da resposta de anticorpos neutralizadores que é típica de infecções com o PRRSV do tipo selvagem. Entretanto, o uso de mutantes de PRRSV hipoglicosilados (que não possuem um ou dois grupamentos de glicano no ectodomínio da GP5) como o vírus de desafio nos ensaios de SN parece ter aumentado significativamente o ponto final dos soros de referência, com a melhoria do título de ponto final variando de seis até vinte e duas vezes (Tabela 3). Esta observação sugere claramente que a remoção de um e particularmente dois, dos grupamentos de glicano aumenta a acessibilidade do epítipo de neutralização aos anticorpos específicos. Estes resultados parecem indicar a presença de uma quantidade significativa de anticorpos neutralizadores para PRRSV nos soros convalescentes infectados com o PRRSV do tipo selvagem que de outra maneira seria indetectável por causa do uso típico do PRRSV do tipo selvagem contendo a GP5 totalmente glicosilada em ensaios de SN.

Tabela 3. Efeito da alteração do padrão de glicosilação da GP5 do PRRSV sobre a capacidade do virion infeccioso de reagir com anticorpos neutralizadores. Os números na Tabela 3 correspondem à diluição do ponto final inversa exibindo neutralização (ponto final de SN).

Soro de animais infectados com 10^5 TCID ₅₀ do PRRSV do tipo selvagem FL12	Cepa de PRRSV utilizada como o desafio para o teste de SN			
	Wt PRRSV (FL12)	FL-N34A	FL-N51A	FL-N34/51A
Animal Nº 11404 (47 dias pi)	1:32	1:256	1:256	1:32,768
Animal Nº 11346 (47 dias pi)	1:8	ND	1:256	1:16,384
Animal Nº 11457 (47 dias pi)	1:16	ND	1:128	1:2,048
Animal Nº 11407 (47 dias pi)	1:8	ND	1:64	1:2,048

5 Influência da hipoglicosilação de GP5 sobre a capacidade do PRRSV de induzir anticorpos neutralizadores *in vivo*

Um efeito notável que foi relatado quando a remoção de carboidratos de uma glicoproteína do envelope viral leva à produção de altos títulos de anticorpos neutralizadores contra o vírus mutante quando este mutante é utilizado para a inoculação *in vivo* do hospedeiro; em alguns casos induzindo também títulos maiores de anticorpo para o vírus do tipo selvagem que o próprio vírus do tipo selvagem. Foram infectados grupos de porcos com doses idênticas do PRRSV do tipo selvagem FL12 ou de cada um dos mutantes com padrões de glicosilação alterados. De forma interessante, a avaliação clínica/virological da infecção através da avaliação da temperatura retal e da avaliação da viremia nos dias 4, 7 e 10 p.i. indicaram um padrão similar de infecção em todos os grupos como descrito anteriormente para FL12 sem evidência de atenuação ou exacerbação de virulência para qualquer um dos mutantes (dados não mostrados). Entretanto, a amostragem sequencial do soro destes animais ao longo de todo um período de 48 dias indicou diferenças pronunciadas entre o PRRSV do tipo selvagem e os mutantes em relação a sua cinética de indução de uma resposta de anticorpos neutralizadores para PRRSV (Tabelas 4A e 4B). Os mutantes desenvolveram uma resposta de anticorpos neutralizadores homóloga mais cedo e mais robusta que a desenvolvida pelo PRRSV do tipo selvagem, até o ponto em

- que, no caso dos mutantes, a natureza caracteristicamente lenta e escassa da resposta de anticorpos neutralizadores de PRRSV parece ter sido corrigida (Tabela 4B). A cinética de aparecimento de anticorpos neutralizadores homólogos para os mutantes (Tabela 4B) indica uma soroconversão de anticorpos neutralizadores mais regular coerente com a descrita para outras infecções virais tal como do vírus influenza ou da Pseudorraiva, mas não para o PRRSV. É de importância máxima o fato de que a infecção com os mutantes de glicosilação de GP5 induzia uma resposta de anticorpos neutralizadores específica ao PRRSV do tipo selvagem que é significativamente maior que a resposta com o próprio PRRSV do tipo selvagem. Os vírus mutantes FL-N34 e FL-N51A induziam níveis cinco vezes maiores ($p < 0,05$) de título de anticorpos neutralizadores contra o PRRSV do tipo selvagem que o próprio PRRSV do tipo selvagem enquanto que o mutante FL-N34/51 induziu um título seis vezes maior ($p < 0,01$) de anticorpos neutralizadores para o PRRSV do tipo selvagem que o próprio PRRSV do tipo selvagem (Tabela 4B).

Grupo infectado com	Atividade dos anticorpos neutralizadores contra FL12 em tempos diferentes PI (dias PI)			
	0	14	21	48
Wt PRRSV FL-12	1,0*	1,0	3,2	25,4
FL-N34A	1,0	1,0	4,0	128,0
FL-N51A	1,0	1,0	4,0	128,0
FL-N34/51A	1,0	1,0	5,0	161,3

Tabela 4A

Grupo infectado com	Título de ponto final contra a cepa infectante homóloga em períodos PI diferentes			
	0	14	21	48
Wt PRRSV FL-12	1,0	1,0	3,2	25,4
FL-N34A	1,0	4,0	128	8,192
FL-N51A	1,0	4,0	128	2,048
FL-N34/51A	1,0	4,0	64	4,096

Tabela 4B

Tabela 4A. Efeito da alteração do padrão de glicosilação da GP5 do PRRSV sobre a capacidade das cepas de PRRSV de indução de anticorpos neutrali-

zadores para o PRRSV do tipo selvagem (4A) ou para a cepa homóloga infectante (4B) (*) Os números nas Tabelas 4A e B correspondem à média geométrica do ponto final de SN para o grupo (n=3).

DISCUSSÃO

5 No presente estudo, foi verificada a influência da glicosilação de GP5 do PRRSV na recuperação do vírus infeccioso, sua função na capacidade dos vírus mutantes de serem neutralizados por anticorpos e na indução de anticorpos neutralizadores *in vivo*. Foi descoberto que todos os três sítios de glicosilação potenciais (N34, N44 e N51) na GP5 são utilizados para a
10 adição de porções de glicano. Os resultados dos presentes inventores revelam que a adição de glicano no sítio N44 é mais crítica para a recuperação de vírus infeccioso. Além disso, os resultados dos presentes inventores mostram que os PRRSVs contendo formas hipoglicosiladas da GP5 são intensamente sensíveis à neutralização por anticorpos e que os vírus mutantes
15 induzem níveis significativamente maiores de anticorpos neutralizadores não somente para os vírus mutantes homólogos, mas também para o PRRSV do tipo selvagem.

A confirmação de que todos os três sítios de glicosilação ligada a N potenciais são utilizados para a adição de glicano na GP5 foi fornecida
20 através da utilização de mutantes com alterações em sítios isolados ou múltiplos (Figura 2). Estudos bioquímicos mostraram que a proteína GP5 do PRRSV quando co-expressa com a proteína M nas células transfectadas, contém glicanas do tipo de alto conteúdo de manose sensíveis a endo H. A observação de que a maior parte da GP5 incorporada nos virions é resistente a endo H (Figura 4A) enquanto que a GP5 expressa na presença da pro-
25 teína M nas células transfectadas é completamente sensível a endo H, é intrigante. É possível que a GP5 quando expressa na presença da proteína M nas células transfectadas, se acumule principalmente no RE ou na região de cis-Golgi e, portanto, permanece sensível a endo H. Entretanto, nas célu-
30 las infectadas pelo PRRSV, a GP5 pode interagir com proteínas virais adicionais e o transporte da GP5 além do RE ou do cis-Golgi é facilitado através da formação de complexos com as outras proteínas virais. De forma co-

erente com esta interpretação, foi observado que nas células infectadas com o PRRSV do tipo selvagem ou mutante, a proteína GP5 é também resistente a endo H. Foi sugerido que a GP5, que é sintetizada no RE nas células infectadas, fosse transportada para as regiões medial- e/ou trans-Golgi onde a maior parte das moléculas de GP5 adquire resistência a endo H antes de serem incorporadas nos virions de PRRSV. Vários estudos com arterivírus incluindo o PRRSV sugerem que a GP5 e a proteína M formem um heterodímero, que pode desempenhar uma função chave na capacidade de infecção viral. No EAV e no LDV, foi demonstrada a interação direta da GP5 e a proteína M através da formação de pontes dissulfeto. Tais interações podem ocorrer antes do processamento adicional de cadeias laterais de oligossacarídeos ligados a N, presumivelmente antes da GP5 ser transportada para fora do RE ou do compartimento de cis-Golgi.

É interessante observar que o padrão de resistência a endo H da GP5 incorporada nos virions do tipo selvagem e mutantes é diferente. Embora a maior parte das moléculas de GP5 no PRRSV do tipo selvagem fosse resistente a endo H, a maioria das moléculas de GP5 nos virions mutantes em um único sítio (FL-N34A e FL-N51A) era sensível a endo H (Figura 4A). Além disso, das duas porções de glicanas nestes mutantes, apenas um era sensível enquanto o outro era resistente. O virion duplo mutante (FL-N34/51A) também incorporava a GP5 que continha glicanas, das quais algumas também eram sensíveis a endo H. Estes dados são coerentes com a interpretação de que os virions de PRRSV do tipo selvagem assim como mutantes incorporam uma população mista de moléculas de GP5 que contêm porções de glicano diferentes em sítios diferentes. Estudos anteriores demonstrando a incorporação de formas diferentemente glicosiladas de GP5 nos virions de PRRSV do tipo selvagem fortalecem adicionalmente a interpretação dos presentes inventores. Partindo do padrão de sensibilidade a endo H da GP5 incorporada nos virions, é tentador especular que o sítio N44 pode conter as glicanas resistentes a endo H, embora algumas moléculas de GP5 com glicanas sensíveis a endo H neste sítio fossem incorporadas nos virions. O fato de que este padrão não usual de glicanas em vários sítios na

GP5 e da incorporação de várias formas de GP5 nos virions possui qualquer relevância para o padrão da resposta imunológica observada em animais infectados pelo PRRSV precisa ser investigado.

Em um estudo recente, foi mostrado que dos dois sítios de glicosilação ligada a N (N46 e N53) na GP5 do PRRSV Lelystad, a glicosilação do resíduo N46 era enormemente necessária para a produção de partículas virais. O rendimento de vírus infeccioso foi reduzido em aproximadamente 100 vezes com a mutação em N46. Os presentes resultados sugerem que a adição de glicano em N44 (para o PRRSV Norte Americano) é absolutamente essencial para a recuperação do PRRSV infeccioso. É possível então que os isolados Europeus e Norte Americanos do PRRSV possam de alguma maneira diferir em relação aos seus requerimentos para a glicosilação ligada a N para a produção de vírus infecciosos. Sob este aspecto, deve ser observado que o vírus Lelystad contém apenas dois sítios de glicosilação ligada a N enquanto que o isolado Norte Americano que foi utilizado neste estudo contém três tais sítios.

A GP5 é a glicoproteína mais importante do PRRSV envolvida na produção de anticorpos neutralizadores e imunidade protetora para o PRRSV. Os resultados dos presentes inventores revelam que a ausência de glicanas nos resíduos 34 e 51 no ectodomínio da GP5, embora gere mutantes de PRRSV viáveis, aumenta tanto a sensibilidade destes mutantes à neutralização por anticorpos assim como a imunogenicidade do epitopo de neutralização próximo. O efeito imediato da ausência de glicanas na GP5 de PRRSVs mutantes foi a maior sensibilidade dos vírus à neutralização por soros convalescentes de porcos infectados com o PRRSV do tipo selvagem (Tabela 3). Estudos com HIV-1 e SIV mostraram que a aquisição ou a remoção de glicanas nas alças variáveis de gp160 modificam a sua sensibilidade à neutralização. Portanto, foi postulado que as glicanas desempenham pelo menos dois tipos de funções essenciais durante a biossíntese da glicoproteína do envelope viral. Em um caso, a ausência de glicanas acarreta em defeitos da glicoproteína e assim, na viabilidade global da cepa viral. Foi postulado que as glicanas em N44 da GP5 do PRRSV têm uma função similar. No

segundo caso, as glicanas servem potencialmente para proteger as proteínas virais contra a neutralização por anticorpos. Para a GP5 do PRRSV, as glicanas em N34 e N51 podem ter uma função similar. No caso do HIV, a "proteção das glicanas" é postulada como sendo um mecanismo primário para explicar a evasão da resposta imunológica neutralizadora, garantindo assim a persistência *in vivo* do HIV. Isto incita a deduzir algumas comparações paralelas com o PRRSV. A infecção com o PRRSV, que é conhecida por persistir durante vários meses nos animais individuais, apresenta um comportamento não usual em termos de indução de uma resposta imunológica neutralizadora específica ao vírus. É bem estabelecido que os animais infectados com o PRRSV levam geralmente mais que o tempo normal para estabelecer uma resposta de anticorpos neutralizadores para PRRSV detectável. Uma vez estabelecida, esta resposta neutralizadora do PRRSV é fraca e varia significativamente de animal para animal. O retardo na resposta de anticorpos neutralizadores foi postulado como sendo causado pela presença de um epitopo de atração imunodominante próximo (posições de aminoácidos 27 até 30), que evoca uma resposta imunológica não protetora precoce robusta que mascara e/ou retarda a resposta para o epitopo neutralizador (posições de aminoácidos 37 até 45) (26, 38). Embora esta seja uma explicação plausível para a qualidade atípica da resposta de anticorpos neutralizadores para PRRSV, precisa ainda ser testada. No laboratório dos presentes inventores, foi provado que a deleção do epitopo de atração é coerentemente letal para a recuperação do PRRSV infeccioso (Ansari e outros, dados não publicados) tornando assim difícil testar esta hipótese.

É possível que um mecanismo alternativo ou complementar para explicar a natureza peculiar da resposta de neutralização do PRRSV pudessem ser previsto pelo fenômeno de "proteção das glicanas" proposto para HIV e SIV. O uso de PRRSVs mutantes que não possuem um ou dois grupamentos de glicano nos presentes estudos fornece evidência pela primeira vez da presença de grandes quantidades de anticorpos neutralizadores de PRRSV nos soros de animais infectados pelo PRRSV do tipo selvagem que eram de outra maneira indetectáveis por causa do uso do PRRSV do tipo selvagem

nos ensaios de SN. Os anticorpos neutralizadores de PRRSV, embora presentes na resposta do hospedeiro, são incapazes de reagir com os virions infectantes do PRRSV do tipo selvagem por causa do bloqueio ou da proteção do epitopo de neutralização pelos grupamentos de glicano na GP5.

5 Um precedente importante para escapar da neutralização pela glicosilação de glicoproteínas nos arterivírus foi descrito para o vírus que eleva a lactato desidrogenase (LDV). O LDV é altamente resistente à neutralização por anticorpos por causa da forte proteção pelas glicanas de sua glicoproteína principal, VP-3, entretanto, certas cepas de LDV que ocorrem
10 naturalmente são altamente susceptíveis à neutralização, por causa da perda dos dois sítios de glicosilação no ectodomínio da VP-3. De maneira interessante, este fenotipo de sensibilidade à neutralização se correlaciona com um alto grau de neurotropismo no hospedeiro adquirido por estas cepas de LDV que podem ser facilmente neutralizadas. Tal aumento na neuropatogenicidade reflete provavelmente na facilitação da interação das glicoproteínas
15 virais com receptores nas células neurais, possivelmente por causa da ausência da proteção de glicanas. No modelo de porcos jovens que foi utilizado para a inoculação com o PRRSV, não foi possível detectar diferenças patogênicas entre qualquer um dos PRRSVs mutantes e o PRRSV do tipo selvagem, embora as limitações tivessem sido limitadas às medidas de temperatura e de viremia. É possível que sob condições experimentais diferentes (isto é, em um modelo de porcas prenhes), algumas alterações na patogenicidade destes PRRSVs mutantes pudessem ser observadas. Não é sabido se a descoberta de cepas de PRRSV hipoglicosiladas que ocorrem naturalmente
20 é uma ocorrência comum, embora relatos anteriores tenham sugerido a sua presença.

Uma observação notável nos presentes experimentos foi que os mutantes da GP5, quando infectam porcos *in vivo*, podem superar o PRRSV do tipo selvagem em relação a sua capacidade de montar uma resposta de
30 neutralização do PRRSV do tipo selvagem que pode ser medida nas fases tardias da infecção (Tabela 4A). Em um cenário paralelo, foram observados não somente títulos de neutralização maiores contra mutantes de PRRSV

homólogos, mas também títulos mensuráveis contra o PRRSV do tipo selvagem (Tabela 4A). Em adição, a resposta ocorrida mais cedo, com títulos de neutralização detectáveis em 14 dias p.i., uma observação que não é tipicamente notada com a infecção pelo PRRSV do tipo selvagem (Tabela 4B). A

5 neutralização aumentada do PRRSV do tipo selvagem pelos soros de porcos infectados com os mutantes do PRRSV sugere que as glicanas estavam mascarando o(s) epitopo(s) de neutralização que não induz(em) os anticorpos neutralizadores quando as glicanas estão presentes. Esta observação tem enorme significado sobre o planejamento de vacinas para PRRSV mais

10 eficientes melhores, sugerindo que novas vacinas planejadas de forma racional devem carregar modificações no padrão de glicosilação da GP5 com a finalidade de melhorar a produção de anticorpos neutralizadores. Em adição, será importante estudar os efeitos que esta remoção de carboidratos das glicoproteínas imunologicamente proeminentes do PRRSV pode ter sobre os títulos crescentes de SN não somente para as cepas de imunização

15 homólogas, mas também para cepas de PRRSV não relacionadas diferentes.

Exemplo 2. Identificação de sítios de Glicosilação ligada a N nos isolados de PRRSV Norte Americano e Europeu

20 Para identificar os sítios de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 que podem ser inativados e utilizados nos métodos desta invenção, as proteínas GP5 de um isolado do PRRSV Norte Americano (Figura 5) ou de um isolado do PRRSV Europeu (Figura 6) desejado são

25 alinhadas com a proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 (cepa Norte Americana NVSL 97-7895). Neste exemplo, os alinhamentos foram criados com o programa MegAlign™ da DNASTAR, Inc. (Madison, WI, USA) utilizando o método de alinhamento de Jotun-Hein (Hein, J.J. Em Methods in Enzymology, Vol. 183: pp. 626-645, 1990). Vários parâmetros de alinhamento de seqüências eram uma penalidade de espaço de 11 e uma penalidade

30 de comprimento de espaço de 3. Para as comparações em pares, foi utilizado um valor de Ktuple de 2.

Na Figura 5, é evidente que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está presente em todos os isolados do PRRSV Norte Americano mostrados e compreende o sítio de glicosilação ligada a N "NGT". Este sítio de glicosilação ligada a N pode ser inativado através da substituição de códons que codificam outros resíduos de aminoácidos tal como glutamina ou alanina pela asparagina 51 na sequência de polinucleotídeo correspondente. Nestes casos, a sequência de aminoácidos correspondente na variação de proteína GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada compreenderia as seqüências tais como "QGT", "AGT" ou "XGT", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina. Estas ou outras variações hipoglicosiladas dos isolados do PRRSV Norte Americano em que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 está inativado também podem ser combinadas com outras variações de GP5 hipoglicosiladas em que outros sítios de glicosilação ligada a N estão inativados.

É também evidente partindo da Figura 5, que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo exatamente à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está presente em apenas certos isolados do PRRSV Norte Americano. Mais especificamente, as proteínas GP5 dos isolados do PRRSV Norte Americano IAF-BAJ (SEQ ID NO: 3), 94-3182 (SEQ ID NO: 7) e 94-287 (SEQ ID NO: 8) contêm o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo exatamente à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 e compreendem o sítio de glicosilação ligada a N "NSS". Este sítio de glicosilação ligada a N das SEQ ID NO: 3, 7 e 8 pode ser inativado através da substituição de códons que codificam outros resíduos de aminoácidos tal como a glutamina ou a alanina pela asparagina 34 na sequência de polinucleotídeo correspondente. Nestes casos, a sequência de aminoácidos correspondente na variação de proteína GP5 do PRRSV Norte Americano hipoglicosilada compreenderia as seqüências tal como "QSS", "ASS" ou "XSS", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina.

Em outros isolados do PRRSV Norte Americano que não possu-

em o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo exatamente à asparagina 34 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1, outros sítios de glicosilação ligada a N localizados no resíduo 30 (Figura 5 "NAS" nas SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13) e no resíduo 33 (Figura 5 "NNS" nas SEQ ID NO: 3, 8; "NSS" nas SEQ ID NO: 6, 10, "NDS" nas SEQ ID NO: 11, 13) também podem estar inativados. Em outras palavras, os sítios de glicosilação ligada a N em outros isolados Norte Americanos localizados nas posições de aminoácidos correspondendo aos resíduos 30 e 33 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 também podem estar inativados e ser utilizados nos métodos desta invenção.

Na Figura 6, é evidente que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 da proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 também está presente em um isolado representativo do PRRSV Europeu e compreende o sítio de glicosilação ligada a N "NGT". Este sítio de glicosilação ligada a N pode ser inativado através da substituição dos códons que codificam outros resíduos de aminoácidos tal como a glutamina ou a alanina pela asparagina 51 na seqüência de polinucleotídeo correspondente. Nestes casos, a seqüência de aminoácidos correspondente na variação da proteína GP5 do PRRSV Europeu hipoglicosilada compreenderia as seqüências tal como "QGT", "AGT" ou "XGT", em que X é qualquer aminoácido sem ser a asparagina. Estas ou outras variações hipoglicosiladas dos isolados do PRRSV Europeu em que o sítio de glicosilação ligada a N correspondendo à asparagina 51 está inativado também podem ser combinadas com outras variações de GP5 hipoglicosiladas em que outros sítios de glicosilação ligada a N estão inativados.

Em vista do que foi descrito anteriormente, será observado que as várias vantagens da invenção são atingidas e realizadas.

As modalidades foram escolhidas e descritas com a finalidade de melhor explicar os princípios da invenção e sua aplicação prática para através das mesmas possibilitar que outros versados na técnica melhor utilizem a invenção em várias modalidades e com várias modificações que são adequadas para o uso particular considerado.

Uma vez que várias modificações poderiam ser feitas nas construções e nos métodos descritos e ilustrados aqui sem sair do âmbito da invenção, é pretendido que toda a matéria contida da descrição anterior ou mostrada nas figuras em anexo seja interpretada como ilustrativa ao invés de limitante. Assim, a extensão e o âmbito da presente invenção não devem ser limitados por qualquer um dos exemplos de modalidades descritos anteriormente, mas devem ser definidos apenas de acordo com as reivindicações a seguir em anexo aqui e os equivalentes das mesmas.

É divulgada aqui uma variedade de referências de patentes e que não são de patentes, das quais cada uma é expressamente incorporada aqui como referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Board of Regents University of Nebraska-Lincoln
 Pattnaik, Asit K
 <120> PROCESSOS E COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO DE ANIMAIS COM ANTÍGENOS
 5 DE PRRSV COM MAIOR IMUNOGENICIDADE
 <130> 46589-62814
 <160> 26
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 10 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 1
 Met Leu Gly Arg Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Leu Ser
 15 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Asn
 20 25 30
 Ser Asn Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
 35 40 45
 20 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Lys Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
 25 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Phe Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
 115 120 125
 30 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile

145 150 155 160
 Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Thr Arg Val
 5 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Leu
 195 200
 <210> 2
 <211> 200
 10 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 2
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 15 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
 20 25 30
 Ser Ser Ser Ser Ser Gln Leu Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Lys Asn Phe Asp Trp Ala Val
 20 50 55 60
 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Val Gly Leu Ile Thr Val
 85 90 95
 25 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Val Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 30 130 135 140
 Leu Leu Asp Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160

Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Asp Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Lys Val
 180 185 190
 5 Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
 195 200
 <210> 3
 <211> 200
 <212> PRT
 10 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 3
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
 15 20 25 30
 Asn Asn Ser Ser Ser Gln Leu Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Lys Asn Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 20 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Val Tyr
 25 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 30 Leu Leu Asp Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Asp Gly His Leu Ile Asp Leu

165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Lys Val
 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
 5 195 200
 <210> 4
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 10 <400> 4
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Val Gly Tyr Cys Ser Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
 20 25 30
 15 Ser Thr Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Glu Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 20 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 100 105 110
 25 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Val
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 30 145 150 155 160
 Val Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Gly Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175

Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 195 200
 5 <210> 5
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 5
 10 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Val Ala Leu Val Asn Ala Asn
 20 25 30
 Thr Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
 15 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 20 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Ala Ile Arg Leu Thr
 25 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 30 Ile Glu Arg Gln Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val

	180	185	190
	Ser Ala Glu Arg Trp Gly Arg Pro		
	195	200	
	<210>	6	
5	<211>	200	
	<212>	PRT	
	<213>	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína	
	<400>	6	
	Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Pro Phe		
10	1	5	10 15
	Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser		
	20	25	30
	Asn Ser Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys		
	35	40	45
15	Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asp Lys Lys Phe Asp Trp Ala Val		
	50	55	60
	Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly		
	65	70	75 80
	Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val		
20	85	90	95
	Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr		
	100	105	110
	Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr		
	115	120	125
25	Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe		
	130	135	140
	Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile		
	145	150	155 160
	Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly Gln Leu Ile Asp Leu		
30	165	170	175
	Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Ile Thr Lys Val		
	180	185	190

Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro

195 200

<210> 7

<211> 200

5 <212> PRT

<213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína

<400> 7

Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Pro Phe

1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Val Leu Val Asn Ala Ser

20 25 30

Pro Asn Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys

35 40 45

Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Ala Arg Phe Asp Trp Ala Val

15 50 55 60

Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Val Thr His Ile Val Ser Tyr Gly

65 70 75 80

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val

85 90 95

20 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr

100 105 110

Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala

115 120 125

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe

25 130 135 140

Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile

145 150 155 160

Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu

165 170 175

30 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val

180 185 190

Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro

195 200

<210> 8

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína

<400> 8

Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe

1 5 10 15

Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser

10 20 25 30

Asn Asn Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys

35 40 45

Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val

50 55 60

15 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly

65 70 75 80

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val

85 90 95

Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr

20 100 105 110

Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala

115 120 125

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe

130 135 140

25 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile

145 150 155 160

Ile Glu Lys Lys Gly Lys Val Glu Val Glu Gly Gln Leu Ile Asp Leu

165 170 175

Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val

30 180 185 190

Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro

195 200

<210> 9
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 5 <400> 9
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
 20 25 30
 10 Ser Ser Ser Ser Ser Gln Leu Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Lys Asn Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 15 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Val Gly Leu Ile Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Ser Val Leu Ser Ser Val Tyr
 100 105 110
 20 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 25 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Asp Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Lys Val
 180 185 190
 30 Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
 195 200
 <210> 10

<211> 200
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 10

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Ser Trp Phe Val Ala Leu Val Ser Ala Ser
 20 25 30
 Asn Ser Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
 10 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 15 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Phe His His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
 20 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 25 Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val
 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 30 195 200
 <210> 11
 <211> 200

<212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 11
 Met Leu Glu Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Leu Ser
 5 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Val Leu Ala Asn Ala Ser
 20 25 30
 Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
 35 40 45
 10 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Ser Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Ala Leu Val Thr Val
 15 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Thr Cys Phe Val Ile Arg Phe Ala
 115 120 125
 20 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ala Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 25 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val
 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 195 200
 30 <210> 12
 <211> 200
 <212> PRT

<213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 <400> 12
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 5 Leu Trp Cys Ile Val Pro Ser Cys Phe Val Ala Leu Val Ser Ala Asn
 20 25 30
 Gly Asn Ser Gly Ser Asn Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp Ala Val
 10 50 55 60
 Glu Cys Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
 85 90 95
 15 Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Met Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 20 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 25 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Ser Arg Pro
 195 200
 <210> 13
 30 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína

<400> 13
 Met Leu Glu Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Val Leu Ala Asn Ala Ser
 5 20 25 30
 Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 10 Glu Ser Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Ala Leu Val Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 15 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Thr Cys Phe Val Ile Arg Phe Ala
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ala Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 20 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Gly Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val
 25 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 195 200
 <210> 14
 <211> 200
 30 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína Consensus
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa pode ser Ser, Asp, Asn ou Thr
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa pode ser Lys, Asn, Glu, Asp, ou Ala
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa pode ser Ile ou Val
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (164)..(164)
 15 <223> Xaa pode ser Gly, Arg, Lys, ou Gln
 <400> 14
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
 20 20 25 30
 Asn Xaa Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Xaa Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 25 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Xaa Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 30 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
 115 120 125

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 5 Ile Glu Lys Xaa Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
 180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 10 195 200
 <210> 15
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
 15 <400> 15
 Met Arg Cys Ser His Lys Leu Gly Arg Phe Leu Thr Pro His Ser Cys
 1 5 10 15
 Phe Trp Trp Leu Phe Leu Leu Cys Thr Gly Leu Ser Trp Ser Phe Ala
 20 25 30
 20 Asp Gly Asn Gly Asp Ser Ser Thr Tyr Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45
 Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ser Ser His Phe Gly Trp
 50 55 60
 Ala Val Glu Thr Phe Val Leu Tyr Pro Val Ala Thr His Ile Leu Ser
 25 65 70 75 80
 Leu Gly Phe Leu Thr Thr Ser His Phe Phe Asp Ala Leu Gly Leu Gly
 85 90 95
 Ala Val Ser Thr Ala Gly Phe Val Gly Gly Arg Tyr Val Leu Cys Ser
 100 105 110
 30 Val Tyr Gly Ala Cys Ala Phe Ala Ala Phe Val Cys Phe Val Ile Arg
 115 120 125
 Ala Ala Lys Asn Cys Met Ala Cys Arg Tyr Ala Arg Thr Arg Phe Thr

	130	135	140
	Asn Phe Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Val His Arg Trp Lys Ser Pro		
	145	150	155 160
	Ile Val Val Glu Lys Leu Gly Lys Ala Glu Val Asp Gly Asn Leu Val		
5	165	170	175
	Thr Ile Lys His Val Val Leu Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Leu Thr		
	180	185	190
	Arg Thr Ser Ala Glu Gln Trp Glu Ala		
	195	200	
10	<210> 16		
	<211> 15414		
	<212> DNA		
	<213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína		
	<400> 16		
15	atgacgtata ggtgttggct ctatgccatg acatttgtat tgtcaggagc tgcgaccatt	60	
	ggtacagccc aaaactagct gcacagaaaa cgcccttctg tgacagccct cttcagggga	120	
	gcttaggggt ctgtccctag caccttgctt ccggagttgc actgctttac ggtctctcca	180	
	accctttaac catgtctggg atacttgatc ggtgcacgtg caccaccaat gccagggtgt	240	
	ttatggcgga gggccaagtc tactgcacac gatgtctcag tgcacggtct ctccttctc	300	
20	tgaatctcca agttcctgag cttggagtgc tgggcctatt ttacaggccc gaagagccac	360	
	tccggtggac gttgccacgt gcattcccca ctgttgagtg ctccccgcc ggggcctgct	420	
	ggctttctgc gatctttcca attgcacgaa tgaccagtgg aaacctgaac tttcaacaaa	480	
	gaatggtgcg ggtcgcagct gagatttaca gagccggcca gtcacccct gcagtcttga	540	
	aggctctaca agtttatgaa cggggttgcc gctggtacct tatagtcgga cctgtccctg	600	
25	gagtggccgt ttttgccaac tcctacatg tgagtataa acctttcccg ggagcaactc	660	
	atgtgctaac caacctgcca ctccgcaga ggcctaagcc tgaagacttt tgcccttttg	720	
	agtgtgctat ggctgacgtc tatgatattg gtcattggcg cgctcatgtat gtggccaaag	780	
	ggaaagtctc ctgggccctt cgtggcgggg atgaggcgaa atttgaaact gtccttaggg	840	
	agttgaagtt gatcggaac caactccaca tctccttccc gcccaccac gcagtggaca	900	
30	tgtctaagtt tgtgttcata gccctggga gtggtgtctc tatgcggtc gagtgccac	960	
	acggctgtct ccccgctaact actgtccctg aaggtaactg ctggtggcg tttttgact	1020	
	cgctccact ggacgttcag aacaaagaaa ttcccggtgc caaccaattc ggctatcaaa	1080	

	ccaagcatgg	tgctgctggc	aagtacctac	aacggaggct	gcaagcta	ggtctccgag	1140
	cagtgactga	tacagatgga	cccattgtcg	tacagtat	ctctgttagg	gagagctgga	1200
	tccgccactt	cagactggcg	gaagagccta	gcctccctgg	gtttgaagac	ctcctcagaa	1260
	taagggtaga	gcccaatacg	tcgccattga	gtgacaaggg	tggaaaaatc	ttccggtttg	1320
5	gcagtcacaa	atggtacggt	gctggaaaga	gagcaaggaa	agcacgctct	ggtatgacca	1380
	ccacagtgcg	tcaccgcgcc	ttgcccgtct	gtgaaatcca	gcaagccaaa	aagcacgagg	1440
	atgccggcgc	tgataaggct	gtgcattctc	ggcactat	tcgcctgcc	gacgggaact	1500
	gtggttggca	ctgcatttcc	gccatcgcca	accgaatggt	gaattccaaa	tttgaaacta	1560
	ctcttcccga	gagggtgaga	ccttcagatg	actgggctac	tgacgaggac	cttgtgaaca	1620
10	ccatccaaat	tctcaagctc	cctgcggcct	tggacaggaa	cgggtgcttg	gttggcgcca	1680
	aatacgtgct	taagctggaa	ggcgagcatt	ggactgtctc	tgtgaccctt	gggatgtccc	1740
	cttctttgct	cccccttgaa	tgtgttcagg	gctgttgtga	gcataagagc	ggacttggtc	1800
	ccccagatgc	ggtcgaagtt	ttcggatttg	accctgcctg	ccttgaccga	ctggctgagg	1860
	taatgcactt	gcctagcagt	gtcatccag	ctgctctggc	cgaaatgtcc	ggcgacccca	1920
15	actgtccggc	ttccccggtc	actactgtgt	ggactgtt	acaattcttt	gcccgccaca	1980
	gaggaggaga	gcaccctgat	cagggtgcgt	taggaaaaat	catcagcctt	tgtcaagttg	2040
	ttgaggaatg	ctgttgccat	cagaataaaa	ccaaccgggc	caccccgga	gaggttgccg	2100
	caaggattga	tcagtacctc	catggtgcaa	caagtcttga	agaatgcttg	attaggcttg	2160
	agagggtttg	cccgccgagc	gctgcggaca	ccttctttga	ttggaatgtt	gtgctccctg	2220
20	gggttggggc	ttcaactcag	acaaccaa	agctccatgt	caaccagtgc	cgcgctctgg	2280
	ttctgtgctg	gactcaagag	cctttggaca	aagactcagt	ccctctgacc	gccttctcgc	2340
	tgtccaattg	ctactatcct	gcacaagg	acgaggttcg	tcaccgtgag	aggctaaact	2400
	ccgtactctc	taagctggag	ggggttggtc	gtgaggaata	tgggctcacg	ccaactgaac	2460
	ctggcccgcg	accgcacta	ccgaacgggc	tcgtcgaa	taaagaccag	atggaggagg	2520
25	atctgctgaa	actagtcaac	gcccaggcaa	cttcagaaat	gatggcctgg	gcagccgagc	2580
	aggttgatct	gaaagcttgg	gtcaaaaact	accacgggtg	gacaccgcca	ccccctccac	2640
	caagagttca	gcctcgaaaa	acaaagtctg	tcaagagctt	gccagggaac	aaacctgtcc	2700
	ccgctccacg	caggaagg	agatctgatt	gtggcagccc	gattttgatg	ggcgacaatg	2760
	ttctgacggg	tcgggaagat	ttgactgttg	gtggccccct	tgatctttcg	acaccatccg	2820
30	agccgatgac	acctctgagt	gagcctgcac	ttatgcccg	gttgcaatat	atttctaggg	2880
	cagtgcacac	tttgagtgtg	ctggccccag	ttctgcacc	gcgtagaact	gtgtcccgc	2940
	cggtagcgcc	cttgagtgag	ccaatttttg	tgtctgcacc	gcgacacaaa	tttcagcagg	3000

	tggaagaagc gaatctggcg gcaacaacgc tgacgcacca ggacgaacct ctagatttgt	3060
	ctgcatcctc acagactgaa tatgaggcctt ctcccctaac accactgcag aacatgggta	3120
	ttctggaggt gggggggcaa gaagctgagg aagttctgag tgaaatctcg gatacactga	3180
	atgacatcaa cctgcacct gtgtcatcaa gcagctccct gtcaagtgtt aagatcacac	3240
5	gccccaaaaca ctctgctcaa gccatcattg actcggggcg gccctgcagt gggcatctcc	3300
	gaagggaaaa agaagcatgc ctcagcatca tgcgtgagggc ttgtgatgcg gctaagctta	3360
	gtgacctgc cacgcaggaa tggctttctc gcatgtggga tagggttgac atgctgactt	3420
	ggcgcaacac gtctgcttac caggcgttcc gcatcttaga tggtaggttt gagtttctcc	3480
	caaagatgat actcgagaca ccgccgccct acccggtgtgg gtttgtgatg ctgcctcaca	3540
10	cgctgcacc ttccgtgggt gcagagagt accttaccat tggttcagtc gccactgaag	3600
	atgttccacg catcctcggg aaaatagaaa acgccggcga gatgcccaac caggggctct	3660
	tgacatcctt cggggaagaa ccgggtgtgcg accaacctgt caaggactcc tggatgtcgt	3720
	cgcggggggtt tgacgagagc acaacggctc cgtccgctgg tacagggtgt gctgacttac	3780
	ccaccgattt gccaccttca gatgggtttgg atgcggacga gtggggggccg ttacggacgg	3840
15	taagaaagaa agctgaaagg ctcttcgacc aattgagccg tcaggttttt aacctcgtct	3900
	cccatctccc tgttttcttc tcacacctct tcaaactctga cagtgggttat tctccgggtg	3960
	attgggggtt tgacgctttt actttatttt gcctcttttt gtgttacagc taaccttct	4020
	ttgggtttgt tcccctcttg ggtgtttttt ctgggtcttc tcggcggtgt cgcatggggg	4080
	tttttggtctg ttggttggt tttgctgttg gcctgttcaa gcctgtgtcc gaccagtcg	4140
20	gcactgcttg tgagtttgac tcgccagagt gtaggaacgt ccttcattct tttgagcttc	4200
	tcaaaccttg ggacctgtt cgcagccttg ttgtgggccc cgtcggctct gcccttgcca	4260
	ttcttggcag gttactgggc ggggcacgct acatctggca ttttttgctt aggccttgga	4320
	ttgttgacga ttgtatcttg gctggagctt atgtgctttc tcaaggtagg tgtaaaaagt	4380
	gctggggatc ttgtgtaaga actgctccta atgaaatcgc cttcaacgtg ttccctttta	4440
25	cgcggtgcgac caggctgtca ctcacgacc tgtgcgatcg gttttgtgcg ccaaaaggca	4500
	tggaccccat tttctcgtct actgggtggc gcgggtgctg gaccggccga agtccattg	4560
	agcaaccctc tgaaaaaacc atcgcgttcg ccagttgga tgaaaagagg attacggcta	4620
	gaactgtggt cgctcagcct tatgatccta accaagccgt aaagtgcttg cgggtgttac	4680
	aggcggtggt ggcgatagt gccgaggcag tcccaaaagt ggtcaagggt tccgctattc	4740
30	cattccgagc tccctttttt ccaccggag tgaaggttga tcttgagtgc aggatcgtgg	4800
	tcgacccga cacttttact acagctctcc ggtctggtta ctccaccaca aacctcgtcc	4860
	ttggtgtggg ggactttgcc caactgaatg gattaaaaat caggcaaatt tccaagccct	4920

	cgaggaggagg cccgcacctc attgctgccc tgcattgttg ttgctcgatg gcgttgacaca	4980
	tgcttgctgg agtttatgta actgcagtg ggtcttgccg taccggcacc aacgatccgt	5040
	ggtgcactaa cccattcgcc gtccctggct acggacctgg ctccctctgc acgtccagat	5100
	tgtgcatctc ccaacatggc cttaccctgc ccttgacagc acttggtggca ggattcggtc	5160
5	ttcaggaaat tgccctagtc gttttgattt tcgtttccat cggaggcatg gctcataggt	5220
	tgagttgtaa ggctgatatg ctgtgcgtct tacttgcaat cgccagctat gtttgggtac	5280
	cccttacctg gttgctctgt gtgtttcctt gctgggtgcg ctggttctct ttgcaccctc	5340
	tcaccattct atggttggtg tttttcttga tgtctgtaaa tatgccttcg ggaatcttaa	5400
	ccgtgggtgt attggttgct ctttggttc taggcccgtta tactaatgtt gttggtcttg	5460
10	ttacccccta tgatattcat cattacacca atggcccccg cgggtgttgcc gccttggtta	5520
	ccgcaccaga tgggacttac ttggccgctg tccgccgcgc tgcgttgact ggccgcaccg	5580
	tgctgtttac cccgtctcag cttgggtccc ttcttgaggg cgctttcaga actcgaaagc	5640
	cctcactgaa caccgtcaat gtggtcgggt cctccatggg ctctggcgga gtgttacta	5700
	tcgatgggaa aattaagtgc gtgactgccg cacatgtcct tacgggtaat tcagctaggg	5760
15	tttccggggt cggcttcaat caaatgcttg actttgatgt aaaaggggac ttcgccatag	5820
	ctgattgccc gaattggcaa ggggctgctc ctaagacca attctgcgag gatggatgga	5880
	ctggccgcgc ctattggctg acatcctctg gcgtcgaaac cgggtgtcatt gggaatggat	5940
	tcgccttctg cttcacccg tgccggcgatt cgggtcccc agtgatcacc gaagccggtg	6000
	agcttgctcg cgttcacaca ggatcaaaca aacaaggagg aggcattgtt acgcgccct	6060
20	ctggccagtt ttgcaatgtg gcacccatca agctgagcga attaagttag ttctttgctg	6120
	gacctaaggt cccgctcggt gatgtgaagg ttggcagcca cataattaaa gacatatgcg	6180
	aggtaccttc agatctttgc gccttgcttg ctgccaaacc cgaactggaa ggaggcctct	6240
	ccaccgtcca acttctgtgt gtgtttttcc tctgtggag aatgatggga catgcctgga	6300
	cgcccttggg tgctgttggg ttttttatct tgaatgaggt tctcccagct gtactggtcc	6360
25	ggagtgtttt ctcttttga atgtttgtgc tatcttggtt cacaccatgg tctgcgcaag	6420
	ttctgatgat caggcttcta acagcagctc ttaacaggaa cagattgtca ctgcctttt	6480
	acagccttgg tgcagcgacc ggttttgcg cagatctggc ggcaactcaa gggcacccgt	6540
	tgcaggcagt aatgaattta agtacctatg ccttctgcc tcggataatg gtcgtgacct	6600
	caccagtccc agtgattgcg tgtggtgttg tgcacctcct tgccataatt ttgtacttgt	6660
30	ttaagtaccg ctgcctgcac aatgtccttg ttggcgatgg tgcgttctct gcggctttct	6720
	tcttgcgata ctttgccgag gggaaattga gggaaggggt gtcgcaatcc tgcgggatga	6780
	atcatgagtc gctgactggg gccctcgcta tgagacttaa tgacgaggac ttggattttc	6840

	ttacgaaatg gactgatttt aagtgttttg tttctgcac caacatgagg aatgcggcgg	6900
	gccagttcat cgaggctgcc tatgctaaag cacttagaat tgaacttgcc cagttggtgc	6960
	aggttgataa gggtcgaggt actttggcca aacttgaagc ttttgctgat accgtggcac	7020
	cccaactctc gcccggtgac attgttggtg ctcttggcca tacgcctgtt ggcggtatct	7080
5	tcgacctaaa gggtggtagc accaagcata ccctccaagc cattgagacc agagtcttg	7140
	ccgggtccaa aatgaccgtg gcgcgtgtcg ttgatccaac cccacaccc ccacccgcac	7200
	ccgtgcctat ccccttcca ccgaaagttc tggagaatgg tcccaacgcc tggggggatg	7260
	aggatcgttt gaataagaag aagaggcgca ggatggaagc cgtcggcatc tttgttatgg	7320
	gtggaagaa atatcagaaa ttttgggaca agaactccgg tgatgtgttt tatgaggagg	7380
10	tccatgataa cacagacgcg tgggagtgc tcagagtga caacctgcc gactttgacc	7440
	ctgagaaggg aactctgtgc gggcactacta ccattgaaga taagacttac agtgtctacg	7500
	cctccccatc tggcaagaaa ttctgtgtcc ccgtctaccc agagagcaaa aaaaaccaat	7560
	gggaagctgc gaagctttcc gtggaacagg cccttggcat gatgaatgtc gacggtgaac	7620
	tgacagccaa agaagtggag aaactgaaaa gaataattga caaactccag ggcttgacta	7680
15	aggagcagtg tttaaactgc tagccgccag cggcttgacc cgctgtggtc gcggcggctt	7740
	ggttggtact gagacagcgg taaaaatagt caaatttcac aaccggacct tcacctagg	7800
	acctgtgaat ttaaaagtgg ccagtgaagt tgagctaaaa gacgcggtcg agcataacca	7860
	acaccggtt gcaagaccgg ttgatgtgtg tggtgtgtc ctgcgtccg cagttccttc	7920
	gcttatagac gtcttaatct ccggcgctga tgcactctcc aagttactcg ccgccacgg	7980
20	gccgggaaac actgggatcg atggcacgct ttgggatttt gaggccgagg ccactaaaga	8040
	ggaaattgca ctcagtgcgc aaataatata ggcttgtgac attaggcgcg gcgacgcacc	8100
	tgaaattggt cttccttata agctgtaccc tgtcaggggc aacctgagc gggtaaaagg	8160
	agttttacag aatacaaggt ttggagacat acctataaa acccccagtg acactggaag	8220
	cccagtgcac gcggctgctt gcctcacgcc caatgccact ccggtgactg atgggcgctc	8280
25	cgtcttggcc acgactatgc cctccggttt tgagttgtat gtaccgacca ttccagcgtc	8340
	tgctcttgat tatcttgatt ctaggcctga ctgccccaaa cagttgacag agcacggctg	8400
	tgaggacgcc gcattaagag acctctccaa gtatgacttg tccaccaag gctttgtttt	8460
	acctggagtt cttgccttg tgcgtaagta cctgtttgct catgtgggta agtgcccgc	8520
	cgttcacggt ccttcactt accctgcaa gaattctatg gctggaataa atgggaacag	8580
30	gtttccaacc aaggacatcc agagcgctcc tgaaatcgac gttctgtgcg cacaggccgt	8640
	gcgggaaaac tggcaactg ttacccttg taccctcaag aaacagtatt gtgggaagaa	8700
	gaagactagg acaatactcg gcaccaataa cttcattgca ctggcccacc gggcagcgtt	8760

	gagtgggtg	accagggct	tcatgaaaa	ggcgtttaac	tcgcccattg	ccctcggtaa	8820
	aaacaaat	aaagagctt	agactccggt	cttaggcagg	tgccctgaag	ctgatcttgc	8880
	atcctgcgat	cgctccacac	ctgcaattgt	ccgctgggtt	gccgccaatc	ttctttatga	8940
	acttgctgt	gctgaagagc	acctgccgtc	gtacgtgttg	aactgctgcc	acgacctact	9000
5	ggtcacgcag	tccggcgag	taactaagag	aggtggcctg	tcgtctggcg	acccgatcac	9060
	ttctgtgtcc	aacaccattt	acagcttgg	gatatatgca	caacacatgg	tgctcagtta	9120
	ctttaaagt	ggtcaccctc	atggccttct	gtttctacaa	gaccagctga	agtttgagga	9180
	catgctcaag	gttcaacccc	tgatcgtcta	ttcggacgac	ctcgtactgt	atgccgagtc	9240
	tcccaccatg	ccaaactacc	actggtggtg	tgaacatctg	aacctgatgc	tgggttttca	9300
10	gacggacca	agaagacag	ccataacaga	ctcgccatca	tttctaggct	gtaggataat	9360
	aaatggacgc	cagctcgtcc	ctaaccgtga	caggattctc	gcggccctcg	cctaccatat	9420
	gaaggcaagc	aatgtctctg	aatactacgc	ctcggcggtg	gcgatactca	tggacagctg	9480
	tgcttgttta	gagtatgatc	ccgaatggtt	tgaagagctt	gtagttggga	tagcgagtg	9540
	tgcccgaag	gacggctaca	gttttcccg	cccgccgttc	ttcttggtcca	tgtgggaaaa	9600
15	actcagatcc	aatcatgagg	ggaagaagtc	cagaatgtgc	gggtactgcg	gggccccggc	9660
	tccgtacgcc	actgcctgtg	gcctcgacgt	ctgtatttac	cacaccact	tccaccagca	9720
	ttgtccagtc	atcatctggt	gtggccaccc	ggctggttct	ggttcttgta	gtgagtgcaa	9780
	accccccta	gggaaaggca	caagccctct	agatgaggtg	ttagaacaag	tcccgtataa	9840
	gcctccacgg	actgtaatca	tgcatgtgga	gcagggtctc	acccctcttg	accaggcag	9900
20	ataccagact	cgccgcggat	tagtctccgt	taggcgtggc	attagaggaa	atgaggttga	9960
	tctaccagac	ggtgattatg	ctagcaccgc	cctactccct	acttgtaaag	agattaacat	10020
	ggtcgtgtg	gcctctaata	tggtgcgcag	caggttcatc	atcgccccgc	ctggtgctgg	10080
	gaaaacatac	tggctccttc	aacaggcca	ggatggtgat	gtcatttaca	cgccaactca	10140
	ccagaccatg	ctcgatatga	ttagggcttt	ggggacgtgc	cggttcaacg	tcccagcagg	10200
25	tacgacgctg	caattccctg	ccccctccg	taccggccct	tgggttcgca	tcctagccgg	10260
	cggttggtgt	cctggcaaga	attccttct	ggatgaagca	gcgtattgta	atcaccttga	10320
	tgtcttgagg	cttcttagca	aaactaccct	cacctgtctg	ggagatttca	aacaactcca	10380
	cccagtggtg	tttgattctc	attgctatgt	ttttgacatc	atgcctcaga	ctcaactgaa	10440
	gaccatctgg	agatttgagc	agaatatctg	tgatgccatt	cagccagatt	acagggacaa	10500
30	acttgatatc	atggtcaaca	caaccggtgt	aacctacgtg	gaaaaacctg	tcaagtatgg	10560
	gcaagtcttc	accccttacc	acagggaccg	agaggacggc	gccatcacia	ttgactccag	10620
	tcaaggcgcc	acatttgatg	tggttacact	gcatttgccc	actaaagatt	cactcaacag	10680

	gcaaagagcc cttgttgcta ttaccagggc aagacatgct atctttgtgt atgaccaca	10740
	caggcaactg cagagcatgt ttgatcttcc tgcgaaaggc acaccctca acctcgtgt	10800
	gcaccgtgac gagcagctga tcgtgctaga tagaaataac aaagaatgca cggttgctca	10860
	ggctctaggc aatggggata aattcagggc cacagacaag cgcgtttag attctctccg	10920
5	cgccatttgt gcagatctgg aagggctcag ctccccgctc cccaaggctc cacacaactt	10980
	gggattttat ttctcgcctg atttgacaca gtttgctaaa ctcccggtag aatttgcacc	11040
	ccactggccc gtggtgacaa cccagaacaa tgaaaagtgg ccagaccggt tggttgctag	11100
	ccttcgcccc gtccataagt atagccgcgc gtgcatcggt gccggctaca tggggggccc	11160
	ctcagtgttt ctgggcaccc ctggggttgt gtcatactat ctacacaaat ttgtcagggg	11220
10	cgaggctcaa atgcttccgg agacagtctt cagcaccggc cgaattgagg tagattgccg	11280
	tgagtatctt gatgaccggg agcgagaaat tgctgagtc ctcccccatg ctttcattgg	11340
	cgacgtcaaa ggcactaccg ttggaggatg tcaccatgtc acctccaaat accttccgcg	11400
	cttccttccc aaggaatcag tcgcggtagt cgggggttca agccccgga aagccgcaa	11460
	agcagtttgc acattaacag atgtgtatct cccagatctc gaagcttacc tccaccaga	11520
15	gaccagtc c aagtgctgga aaatgatgtt ggacttcaag gaagttcgac tgatggctctg	11580
	gaaggacaag acggcctatt ttcaacttga aggcgcccat ttcacctggt accagcttgc	11640
	aagctatgcc tcgtacatcc gagttcctgt taactctacg gtgtatttgg acccctgcat	11700
	gggccctgcc ctttgcaaca gaagagtgtt cgggtccact cattggggag ctgacctcgc	11760
	agtcaccctt tatgattacg gtgccaaaat catcctgtct agtgcatacc atggtgaaat	11820
20	gccccctggg taaaaatcc tggcgtgcgc ggagttctcg cttgacgatc cagtgaggta	11880
	caaacacacc tgggggtttg aatcggtac agcgtatctg tacgagttca ccggaaacgg	11940
	tgaggactgg gaggattaca atgatgcgtt tcgtgcgcgc cagaaaggga aaatttataa	12000
	ggccactgcc accagcatga ggtttcattt tccccgggc cctgtcattg aaccaacttt	12060
	aggcctgaat tgaaatgaaa tgggggtccat gcaaagctc tttgacaaaa ttggccaact	12120
25	ttttgtggat gctttcacgg aatttttggg gtccattgtt gatatcatca tatttttggc	12180
	cattttgttt ggctttacca tcgtggctg gctgggtgtc ttctgcatcc gattggtttg	12240
	ctccgcggtc ctccgtgcgc gccctaccat tcacctgag caattacaga agatcctatg	12300
	aggcctttct ttctcagtgc cagggtgata ttccacctg gggaactaga catccctggg	12360
	ggatgctttg gcaccataag gtgtcaaccc tgattgatga aatgggtgtc cgtcggatgt	12420
30	accgcaccat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaaaca ggtgggtgagc gaggccacgc	12480
	tgtctcgc atagtgggttg gatgtggtgg ctcatcttca gcatcttgcc gccattgaag	12540
	ccgagacctg taaatatttg gcctctcggc tgcccatgct acacaatctg cgcattgacag	12600

	gggtcaaatgt aaccatagtg tataatagta ctttgaatca ggtgtttgct atttttccaa	12660
	cccctggatc ccggccaaag cttcatgatt ttcagcaatg gctaatagct gtgcactcct	12720
	ccatattttc ctccgttgcg gcttcttgta ctctttttgt tgtgctgtgg ttgcggttc	12780
	caatactacg tactgttttt ggtttccgct ggtaggggc aatttttcct tcgaactcac	12840
5	gggtgaattac acggtgtgtc cgccttgct caccgggcaa gcagccgctg aggtctacga	12900
	accaggcagg tctctttggt gcaggatagg gcatgaccga tgtagttagg acgaccatga	12960
	cgatctaggg ttcattgttc cgcctggcct ctccagcgaa ggccacttga ccagtgttta	13020
	cgcctgggtg gcgttctgt ccttcagcta caggcccgag ttccatccc agatatttgg	13080
	gatagggaat gtgagtcaag tttatgttga catcaagcac caattcatct gcgcgttca	13140
10	cgacggggag aacgccacct tgctcgtca tgacaatatt tcagccgtat ttcagaccta	13200
	ctaccaacat caagtcgacg gcggcaattg gtttcaccta gaatggctgc gccccttctt	13260
	ttcctcttgg ttggttttaa atgtttcttg gtttctcagg cgttcgctg caagccatgt	13320
	ttcagttcaa gtctttcgga catcaaaacc aacactaccg cagcatcagg ctttgttgc	13380
	ctccaggaca tcagctgcct taggcattgc gactcgtcct ctccagacgat tcgcaaaagc	13440
15	tctcagtgcc gcgcggcgat agggacgccc gtgtacatca ctgtcacagc caatgtcaca	13500
	gatgagaatt atttacattc ttctgatctc cttatgcttt cttcttgctt tttctatgct	13560
	tctgagatga gtgaaaaggg attcaagggt atatttggca atgtgtcagg catcgtggct	13620
	gtgtgtgtca actttaccag ctacgtccaa catgtcaagg agtttaccca acgtccttg	13680
	gtggtcgac atgtgcggct gctccatttc atgacacctg agaccatgag gtgggcaacc	13740
20	gttttagcct gtttttttgc catcttactg gcaatttgaa tgttcaagta tgttggggag	13800
	atgcttgacc gcgggctgtt gctcgcgatt gctttctttg tgggtgatcg tgccattttg	13860
	ttttgtgcg ctcgtaacg ccaacagcaa cagcagctct catcttcagt tgatttacia	13920
	cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggctgaaa gacaaatttg attgggcagt	13980
	ggagactttt gtcattcttc ccgtgttgac tcacattgtc tcatatggtg cactcaccac	14040
25	tagccatttc cttgacacag tcggtctggt tactgtgtct accgccgggt tctaccacg	14100
	gcggtatggt ctgagtagca tctacgcggt ctgcgctctg gccgcattga tttgcttcgt	14160
	cattaggctt gcgaagaact gcatgtcctg gcgctactct tgtaccagat atactaactt	14220
	ccttctggac actaagggca gactctatcg ctggcggctg cccgttatca tagagaaagg	14280
	gggtaagggt gaggtcgaag gtcacctgat cgacctcaa agagttgtgc ttgatggttc	14340
30	cgtggcaacc cctttaacca gagtttcagc ggaacaatgg ggtcgtcttt agacgacttt	14400
	tgctatgata gcacggctcc acaaaagggt cttttggcgt tttccattac ctacacgcca	14460
	gtgatgatat atgctctaaa ggtaagtcgc ggccgacttt tagggcttct gcaccttttg	14520

	atctttctga attgtacttt taccttcggg tacatgacat tcgtgcactt taatagcaca	14580
	aataaggctcg cgctcactat gggagcagta gttgcacttc tttgggggggt gtactcagcc	14640
	atagaaacct ggaagttcat cacctccaga tgccgtttgt gcttgctagg ccgcaagtac	14700
	attctggccc ccgcccacca cgtcgaaagt gccgcgggct ttcattccgat cgcggcaaat	14760
5	gataaccacg catttgctcg ccggcgctccc ggctccacta cggttaacgg cacattgggtg	14820
	cccgggttga aaagcctcgt gttgggtggc agaaaagctg ttaaacaggg agtggtaaac	14880
	cttgtcaaat atgccaaata acaacggcaa gcagcaaaag aaaaagaggg ggaatggcca	14940
	gccagtcaat cagctgtgcc agatgctggg taagatcatc gccagcaaa accagtccag	15000
	aggcaaggga ccggggaaga aaattaagaa taaaaaccgg gagaagcccc attttcctct	15060
10	agcgactgaa gatgacgtca ggcattcactt caccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc	15120
	gtcgatccag actgccttta accagggcgc tggaacctgt accctatcag attcaggtag	15180
	gataagttac actgtggagt ttagtttgcc gacgcattcat actgtgcgcc tgatccgcgt	15240
	cacagcgcca tcattcagcg aatgggctgg cattccttaa gcacctcagt gttagaattg	15300
	gaagaatgtg tggatgaatgg cactgattgg cactgtgcct ctaagtcacc tattcaatta	15360
15	gggcgaccgt gtgggggtta agtttaattg gcgagaacca tgccggccgaa atta	15414
	<210> 17	
	<211> 15451	
	<212> DNA	
	<213> Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína	
20	<400> 17	
	tatgacgtat aggtgttggc tctatgcctt ggcatttcta ttgtcaggag ctgtgaccat	60
	tgccacagcc caaaacttgc tgcacagaaa cacccttctg tgatagcctc cttcagggga	120
	gcttaggggt tgtccctagc accttgcttc cggagttgca ctgctttacg gtctctccac	180
	ccctttaacc atgtctggga tacttgatcg gtgcacgtgt accccaatg ccagggtgtt	240
25	tatggcggag ggccaagtat actgcacacg atgcctcagt gcacggcttc tccttccct	300
	gaacctccaa gtttctgagc tcgggggtgct aggcctatc tacaggcccg aagagccact	360
	ccggtggacg ttgccacgtg cattccccac tgttgagtgc tccccgccg gggcctgctg	420
	gctttctgca atctttccaa tcgcacgaat gaccagtgga aacctgaact tccaacaaag	480
	aatggtacgg gtgcgacgtg agctttacag agccggccag ctcacctctg cagtcttgaa	540
30	ggctctacaa gtttatgaac ggggttgccg ctggtacccc attggtggac ctgtccctgg	600
	agtgcccggt ttccccaatt ccctacatgt gagtgataaa cctttcccg gagcaactca	660
	cgtgttgacc aacctgccgc tcccgcagag acccaagcct gaagactttt gcccttttga	720

	gtgtgctatg gctactgtct atgacattgg tcatgacgcc gtcattgtatg tggccgaaag	780
	gaaagtctcc tgggcccctc gtggcgggga tgaagtgaag tttgaagctg tccccgggga	840
	gttgaagttg attgcgaacc ggctccgcac ctccctcccg cccaccaca cagtggacat	900
	gtctaagttc gccttcacag cccctgggtg tgggtgttct atgcgggtcg aacgccaaca	960
5	eggctgcctt cccgctgaca ctgtccctga aggcaactgc tgggtggagct tgtttgactt	1020
	gcttccactg gaagttcaga acaaagaaat tcgccatgct aaccaatttg gctatcagac	1080
	caagcatggt gtctctggca agtacctaca gcggaggctg caagttaatg gtctccgagc	1140
	agtaactgac ctaaaccggac ctatcgctgt acagtacttc tccgttaagg agagttggat	1200
	ccgccatttg aaactggcgg gagaaccag ctactctggg tttgaggacc tcttcagaat	1260
10	aagggttgag cctaaccagt cgccattggc tgacaaggaa gaaaaaattt tccggttttg	1320
	cagtcacaag tggtagcgcg ctggaaagag agcaagaaaa gcacgctctt gtgcgactgc	1380
	tacagtcgct ggccgcgctt tgtccgttcg tgaaaccggg caggccaagg agcacgaggt	1440
	tgccggcgcc aacaaggctg agcacctcaa aactactcc ccgcctgccg aagggaattg	1500
	tggttggcac tgcatttccg ccatcgccaa ccggatgggt aattccaaat ttgaaaccac	1560
15	ccttcccga agagtggagc ctccagatga ctgggctact gacgaggatc ttgtgaatgc	1620
	catccaaatc ctgagactcc ctgcggcctt agacaggaac ggtgcttgta ctacgcca	1680
	gtacgtactt aagctggaag gtgagcattg gactgtcact gtgaccctg ggatgtcccc	1740
	ttctttgtc cctcttgaat gtgttcaggg ctgttgtggg cacaagggcg gtcttggttc	1800
	cccagatgca gtcgaggtct ccggatttga ccctgcctgc cttgaccggc tggctgaggt	1860
20	gatgcacctg cctagcagtg ctatcccagc cgctctggcc gaaatgtctg gcgattccga	1920
	tcgttcggct tctccggtca ccaccgtgtg gactgtttcg cagttctttg cccgtcacag	1980
	cggagggaaat caccctgacc aagtgcgctt agggaaaatt atcagccttt gtcaggtgat	2040
	tgaggactgc tgctgttccc agaacaaaac caaccgggtc accccggagg aggtcgcagc	2100
	aaagattgac ctgtacctcc gtggtgcaac aaatcttgaa gaatgcttgg ccaggcttga	2160
25	gaaagcgcgc ccgccacgcg taatcgacac ctcccttgat tgggatgttg tgctccctgg	2220
	ggttgaggcg gcaaccaga cgatcaagct gcccaggtc aaccagtgtc gtgctctggt	2280
	ccctgttgtg actcaaaagt ccttgacaa caactcggtc cccctgaccg ctttttact	2340
	ggctaactac tactaccgtg cgcaaggtga cgaagtctgt caccgtgaaa gactaaccgc	2400
	cgtgctctcc aagttggaaa aggttggtcg agaagaatat gggctcatgc caaccgagcc	2460
30	tggttccagg ccacactgc cagcggggtc cgacgaactc aaagaccaga tggaggagga	2520
	cttgctgaaa ctggctaacc cccagacgac ttcggacatg atggcctggg cagtcgagca	2580
	ggttgacctt aaaacttggg tcaagaacta cccgcggtgg acaccaccac cccctccgcc	2640

	aaaagttcag cctcgaaaaa cgaagcctgt caagagcttg ccggagagaa agcctgtccc	2700
	cgccccgcgc aggaaggttg ggtccgattg tggcagcccc gtttcattag gcggcgatgt	2760
	ccctaacagt tgggaagatt tggctgttag tagccccctt gatctccga cccacactga	2820
	gccggcaaca cttcaagtg agctgggtgat tgtgtctca ccgcaatgca tcttcaggcc	2880
5	ggcgacaccc ttgagtgagc cggctccaat tccgcacct cgcggaactg tgtctcgacc	2940
	ggtgacaccc ttgagtgagc cgatccctgt gcccgacccg cggcgtaagt ttcagcaggt	3000
	gaaaagattg agttcggcgg cggcaatccc accgtaccag gacgagcccc tggatttgtc	3060
	tgttctctca cagactgaat atgaggcctc tccccagca ccgcccaga gcgggggcgt	3120
	tctgggagta gaggggcatg aagctgagga aaccctgagt gaaatctcgg acatgtcggg	3180
10	taacattaaa cctgcgtccg tgtcatcaag cagctccttg tccagcgtga gaatcacacg	3240
	cccaaaatac tcagctcaag ccatcatcga ctccggcggg cctgcagtg ggcattctca	3300
	agaggtaaag gaaacatgcc ttagtgtcat gcgcgaggca tgtgatgcga ctaagcttga	3360
	tgacctgct acgcaggaat ggctttctcg catgtgggat cgggtggaca tgctgacttg	3420
	gcgcaacacg tctgtttacc aggcgatttg caccttagat ggcaggtaa agttcctccc	3480
15	aaaaatgata ctcgagacac cgccgccta tccgtgtgag tttgtgatga tgcctcacac	3540
	gcctgcacct tccgtaggtg cggagagcga ccttaccatt ggctcagttg ctactgaaga	3600
	tgttccacgc atcctcgaga aaatagaaaa tgcggcgag atggccaacc agggaccctt	3660
	ggccttctcc gaggataaac cggtagatga ccaactgtc aacgaccccc ggatatcgtc	3720
	gcggaggcct gacgagagca catcagctcc gtccgcaggc acaggtggcg ccggctcttt	3780
20	taccgatttg ccgccttcag atggcgcgga tgcggacggg ggggggccgt ttcggacggt	3840
	aaaaagaaaa gctgaaaggc tctttgacca actgagccgt caggtttttg acctcgtctc	3900
	ccatctccct gttttcttct cagcctttt ctaccctggc ggtggttatt ctccgggtga	3960
	ttggggtttt gcagctttta ctctattgtg cctcttttta tgttacagtt acccagcctt	4020
	tggtattgct cccctcttgg gtgtgttttc tgggtcttct cggcgcgttc gaatgggggt	4080
25	ttttggctgc tggttggctt ttgctgttg tctgttcaag cctgtgtccg acccagtcgg	4140
	cgctgcttgt gagtttgact cgccagagt tagaaacatc cttcattctt ttgagcttct	4200
	caaaccttgg gacctgttc gcagccttgt tgtgggcccc gtcggtctcg gtcttgccat	4260
	tcttggcagg ttactgggcg gggcacgctg catctggcac tttttgctta ggcttggcat	4320
	tgttgacagc tgtatcttgg ctggagctta cgtgctttct caaggtaggt gtaaaaagt	4380
30	ctggggatct tgtataagaa ctgctcctaa tgaggtcgct tttaacgtgt ttcctttcac	4440
	acgtgcgacc aggtcgtcac ttatcgacct gtgcgacgg ttttgtgcgc caaaaggaat	4500
	ggaccccat tttctcgca ctgggtggcg cgggtgctgg gccggccgaa gccccattga	4560

	gcaaccctct gaaaaaccca tcgcgtttgc ccaattggat gaaaagaaga ttacggctag	4620
	gactgtgggc gccagcctt atgaccccaa ccaagccgta aagtgcctgc gggattgca	4680
	ggcgggtggg gcgatggtgg ctaaggcggt cccaaaagtg gtcaagggtt ccgctgttcc	4740
	attccgagcc cccttctttc ccaactggagt gaaagttgac cctgattgca gggctgtggt	4800
5	tgaccctgac actttcactg cagctctccg gtctggctac tccaccacaa acctcgctct	4860
	tgggtgtaggg gactttgccc agctgaatgg attaaaaatc aggcaaattt ccaagccttc	4920
	agggggaggg ccacatctca tggctgccct gcatgttgcc tgctcgatgg ctctgcacat	4980
	gcttgctggg atttatgtga ctgcggtggg ttcttgccgc accggcacca acgaccctg	5040
	gtgcgctaac ccgtttgcg tccctggcta cggacctggc tctctctgca cgtccagatt	5100
10	gtgcatttcc caacacggcc ttaccctgcc cttgacagca cttgtggcgg gattcggat	5160
	tcaagaaatt gccttggtcg ttttgatttt tgtttccatc ggaggcatgg ctcatagggt	5220
	gagctgtaag gctgacatgc tgtgtgtttt gcttgcaatt gccagctatg tttgggtacc	5280
	tcttacctgg ttgctttgtg tgtttccttg ctggttgccg tgtttttctt tgcacccct	5340
	caccatccta tggttggtgt ttttcttgat ttctgtgaat atgccttcag gaatcttggc	5400
15	catggtgttg ttggtttctc tttggcttct tggctggtat actaatgttg ctggccttgt	5460
	caccccttac gacattcatc attacaccag tggcccccgc ggtgttgccg ccttggtat	5520
	cgcaccagat gggacctact tggccgctgt ccgccgcgt gcgttgactg gccgcaccat	5580
	gctgtttacc ccgtcccagc ttgggtctct acttgagggt gctttcagaa ctcgaaagcc	5640
	ctcactgaac accgtcaatg tgatcgggtc ctccatgggc tctggcgggg tgtttaccat	5700
20	cgacgggaaa gtcaagtgcg taactgccgc acatgtcctt acgggcaatt cagctcgggt	5760
	ttccggggtc ggcttcaatc aaatgcttga ctttgacgta aaggagatt tcgctatagc	5820
	tgattgcccg aattggcaag gggctgcccc caagacccaa ttctgcacgg atggatggac	5880
	tggccgtgcc tattggctaa catcctctgg cgtcgaacct ggctcattg gaaaaggatt	5940
	cgccttctgc ttcaccgat gtggcgattc cgggtcccca gtgatcaccg aggccggtga	6000
25	gcttgctggc gttcacacgg gatcgaataa acaagggggg ggcattgtta cgcgccctc	6060
	aggccagttt tgtaatgtgg caccatcaa gctaagcgaa ttaagtgaat tctttgctgg	6120
	gcctaaggtc ccgctcgggt atgtgaaggt cggcagccac ataattaaag acataagcga	6180
	ggtgccttca gatctttgtg ccttgcttgc tgccaaacct gaactggaag gaggcctctc	6240
	caccgtccaa cttctttgtg tgtttttct cctgtggaga atgatgggac atgcctggac	6300
30	gcccttggtt gctgtgagtt tctttatctt gaatgaggt ctcccagccg tcttggtccg	6360
	gagtgttttc tcctttggaa tgtttgtgct atcctggctc acgccatggt ctgcgcaagt	6420
	tctgatgac aggcttctga cagcagctct taacaggaac agatggtcac ttgccttttt	6480

	cagcctcggg	gcagtgaccg	gttttgctgc	agatcttgcg	gccactcagg	ggcatccggt	6540
	gcaggcagtg	atgaatttga	gcacctatgc	attcctgcct	cggatgatgg	ttgtgacctc	6600
	accagtccca	gtgatcacgt	gtggtgctgt	gcacctactt	gccatcattt	tgtacttggt	6660
	taagtaccgt	ggcccgacc	atatccttgt	tggcgatgga	gtgttctctg	cggctttctt	6720
5	cttgagatac	tttgccgagg	gaaagttgag	ggaaggggtg	tcgcaatcct	gcggaatgaa	6780
	tcattgagct	ctgactgggt	ccctcgctat	gagactcaat	gacgaggact	tggatttcct	6840
	tatgaaatgg	actaatttta	agtgtcttgt	ttctgcgtcc	aacatgagga	atgcagcggg	6900
	tcaatttatc	gaggctgcct	atgctaaagc	acttagagta	gaactggccc	agttgggtgca	6960
	ggttgacaaa	gttcgaggta	ctttggccaa	acttgaagct	tttgctgata	ccgtggcacc	7020
10	tcaactctcg	cccggtgaca	ttgttgctgc	tctcgccac	acgcctgttg	gcagtatctt	7080
	cgacctaaag	gttggttagca	ccaagcatac	cctccaagcc	attgagacca	gagtccttgc	7140
	tgggtccaaa	atgaccgtgg	cgcgcgtcgt	cgaccgcacc	cccacgcccc	caccgcacc	7200
	cgtgcccatc	cccctccac	cgaaagtctt	ggagaatggc	cccaacgctt	ggggggatga	7260
	ggaccgtttg	aataagaaga	agaggcgag	gatggaagcc	ctcgcatctt	atgttatggg	7320
15	cgggaaaaag	taccagaaat	tttgggacaa	gaattccggt	gatgtgtttt	atgaggaggt	7380
	ccataataac	acagatgagt	gggagtgtct	cagagttggc	gacctgccc	actttgacct	7440
	tgagaaggga	actctgtgtg	gacatgtcac	cattgaaaac	aaggcttacc	atgtttacac	7500
	ctccccatct	ggtaagaagt	tcttgggtccc	cgtcaaccca	gagaatggaa	gagtccaatg	7560
	ggaagctgca	aagctttccg	tggagcaggc	cctaggtatg	atgaatgtcg	acggcgaact	7620
20	gactgccaaa	gaactggaga	aactgaaaag	aataattgac	aaactccagg	gcctgactaa	7680
	ggagcagtg	ttaactgtct	agccgccagc	gacttgacct	gctgtggtcg	cggcggcttg	7740
	gttgttactg	aaacagcgg	aaaaatagtc	aaatttcaca	accggacctt	cacctggga	7800
	cctgtgaatt	taaaagtggc	cagtgaggtt	gagctaaaag	acgcggttga	gcacaaccaa	7860
	cacccggttg	cgagaccgat	cgatgggtga	gttgtgtccc	tgcgttccgc	ggttccttcg	7920
25	cttatagacg	tcttgatctc	cgggtgctgat	gcattctcca	agttacttgc	ccatcacggg	7980
	ccgggaaaca	ctgggatcga	tggcacgctc	tgggattttg	agtccgaagc	cactaaagag	8040
	gaagtcgcac	tcagtgcgca	aataatacag	gcttggtgaca	ttaggcgcgg	cgacgctcct	8100
	gaaattggtc	tcctttacaa	gctgtaccct	gttaggggta	accctgagcg	ggtgaaagga	8160
	gttctgcaga	atacaagggt	tggagacata	ccttacaaaa	ccccagtgca	cactggaagc	8220
30	ccagtgcacg	cggctgcctg	ccttacgccc	aacgccactc	cggtgactga	tgggcgctcc	8280
	gtcttgacca	cgaccatgcc	ccccgggttt	gagttatatg	taccgaccat	accagcgtct	8340
	gtccttgatt	accttgactc	taggcctgac	tgccctaaac	agctgacaga	gcacggctgc	8400

	gaagatgccg cactgaaaga cctctctaaa tatgacttgt ccaccaagg ctttgtttta	8460
	cctggagttc ttcgccttgt gcggaatac ctgtttgccc atgtaggtaa gtgcccaccc	8520
	gttcatcggc cttctactta ccctgctaag aattctatgg ctggaataaa tgggaacagg	8580
	ttcccaacca aggacattca gagcgtcctt gaaatcgacg ttctgtgcgc acaggctgtg	8640
5	cgagaaaact ggcaaactgt cacccttgtt actottaaga aacagtattg cgggaagaag	8700
	aagactagga ccatactcgg caccaataac ttcacgcac tagccaccg agcagtgttg	8760
	agtgggttta cccagggctt catgaaaaag gcgtttaact cgcccatcgc cctcggaag	8820
	aacaagttta aggagctaca gactccggtc ctgggcaggt gccttgaagc tgatctcgca	8880
	tcttgcgac gatccacgcc tgcaattgtc cgctgggttg ccgccaacct tctttatgaa	8940
10	cttgctgtg ctgaagagca tctaccgtcg tacgtgtga actgtgccca cgacttactg	9000
	gtcacgcagt ccggcgcagt gactaagaga ggtggcctgt cgtctggcga cccgatcacc	9060
	tctgtgtcta acaccattta tagtttggtg atctatgcac agcatatggt gcttagttac	9120
	ttcaaaagtg gtcaccccca tggccttctg ttcttacaag accagctaaa gtttgaggac	9180
	atgctcaagg ttcaaccctt gatcgtctat tcggacgacc tcgtgctgta tgccgagtct	9240
15	cccaccatgc caaactatca ctgggtgggtt gaacatctga atttgatgct ggggtttcag	9300
	acggacccaa agaagacagc aataacagac tcgccatcat ttctaggctg tagaataata	9360
	aatgggcgcc agctagtcct caaccgtgac aggatcctcg cgccctcgc ctatcacatg	9420
	aaggcgagta atgtttctga atactatgcc tcagcggctg caatactcat ggacagctgt	9480
	gcttgttttg agtatgatcc tgaatggtt gaagaacttg tagttggaat agcgcagtgc	9540
20	gcccgaagg acggctacag ctttcccgcc acgcggttct tcatgtccat gtgggaaaaa	9600
	ctcaggcca attatgaggg gaagaagtcg agagtgtgcg ggtactgcg ggccccggcc	9660
	ccgtacgcta ctgcctgtgg cctcgacgtc tgcatttacc acaccactt ccaccagcat	9720
	tgtccagtca caatctggtg tggccatcca gcgggttctg gttctttag tgagtcaaaa	9780
	tccctgtag ggaaaggcac aagcccttta gacgaggtgc tggaacaagt cccgtataag	9840
25	ccccacgga ccgttatcat gcatgtggag caggtgtctca ccccttga tccaggtaga	9900
	taccaaactc gccgcggatt agtctctgtc aggcgtggaa ttaggggaaa tgaagttgaa	9960
	ctaccagacg gtgattatgc tagcaccgcc ttgctcccta cctgcaaaga gatcaacatg	10020
	gtcgtgtcg cttccaatgt attgcgcagc aggttcatca tcggcccacc cgggtgctggg	10080
	aaaacatact ggctccttca acagggtccag gatggtgatg ttatttacac accaactcac	10140
30	cagaccatgc ttgacatgat tagggcttgg gggacgtgcc ggttcaacgt cccggcaggc	10200
	acaacgctgc aattccccgt cccctccgc accggtccgt gggttcgcat cctagccggc	10260
	ggttggtgtc ctggcaagaa ttccttcta gatgaagcag cgtattgcaa tcaccttgat	10320

	gttttgaggc ttcttagtaa aactaccctc acctgtctag gagacttcaa gcaactccac	10380
	ccagtggggtt ttgattctca ttgctatggt tttgacatca tgctctaaac tcaactgaag	10440
	accatctgga gggttggaac gaatatctgt gatgccattc agccagatta cagggacaaa	10500
	ctcatgtcca tgggtcaacac aaccctgtgt acctacgtgg aaaaacctgt caggatggg	10560
5	caggctctca cccctacca cagggaccga gaggacgacg ccatcactat tgactccagt	10620
	caaggcgcca cattcgatgt ggtcacattg catttgccca ctaaagattc actcaacagg	10680
	caaagagccc ttgttgccat caccagggca agacacgcta tctttgtgta tgaccacac	10740
	aggcagctgc agggcttggt tgatcttctt gcaaaaggca caccctcaa cctcgagtg	10800
	caccgagacg ggcagctgat cgtgctggat agaaataaca aagaatgcac ggttgctcag	10860
10	gctctaggca acggggataa atttagggcc acagacaagc gtgttgtaga ttctctccgc	10920
	gccatttggt ctgatctaga agggctgagc tctccgctcc ccaaggctgc acacaacttg	10980
	ggattttatt tctcacctga tttaacacag tttgctaaac tcccagtaga acttgacact	11040
	cactggcccc tgggtgacaac ccagaacaat gaaaagtggc cagatcggtt ggttgccagc	11100
	cttcgcccta tcataaata cagccgcgcg tgcacgggtg ccggctatat ggtgggccct	11160
15	tcggtgtttc taggcactcc tggggctcgtg tcatactatc tcacaaaatt tgtaagggc	11220
	gaggctcaag tgcttccgga gacgggtttc agcaccggcc gaattgaggt agactgccg	11280
	gaatatcttg atgatcgga gcgagaagtt gctgctccc tcccacagc ttctattggc	11340
	gacgtcaaag gcaactacgt tggaggatgt catcatgtca cctccagata cctccgcgc	11400
	gtccttccca aggaatcagt tgcggtagtc ggggtttcaa gcccggaaa agccgcgaaa	11460
20	gcattgtgca cactgacaga tgtgtacctc ccagatcttg aagcctatct ccaccggag	11520
	accagtgcca agtgctggaa aatgatgttg gacttcaaag aagttcgact aatggcttg	11580
	aaagacaaaa cagcctatct ccaacttgaa ggtcgctatt tcacctgga tcagcttgcc	11640
	agctatgcct cgtacatccg tgttctgtc aactctacgg tgtacttgga ccctgcatg	11700
	ggccccgccc tttgcaacag gagagtcgtc ggggtccacc actggggggc tgacctgcg	11760
25	gtcaccctt atgattacg cgctaaaatt atctgtcta gcgcgtacca tggtgaaatg	11820
	cccccggtt acaaaattct ggcgtgcgcg gagttctcgt tggatgacct agttaagtac	11880
	aaacatacct gggggtttga atcgataca gcgtatctgt atgagttcac cggaaacggt	11940
	gaggactggg aggattacaa tgatgcgttt cgtgcgcgcc aggaaggga aatttataag	12000
	gccactgcca ccagcttgaa gttttatctt ccccgggcc ctgtcattga accaacttta	12060
30	ggcctgaatt gaaatgaaat ggggtccatg caaagccttt ttgacaaaat tggccaactt	12120
	tttgtggatg ctttcacgga gttcttggtg tccattgttg atatcattat atttttggcc	12180
	attttgtttg gcttcacat cgccggttgg ctggtggtct tttgcatcag attggtttgc	12240

tccgcgatac tccgtacgcg cccgtgccatt cactctgagc aattacagaa gatcttatga 12300
 ggccctttctt tcccagtgcc aagtggacat tcccacctgg ggaactaaac atcctttggg 12360
 gatgcttttg caccataagg tgtcaaccct gattgatgaa atgggtgctgc gtcgaatgta 12420
 ccgcatcatg gaaaaagcag ggcaggctgc ctggaaacag gtggtgagcg aggctacgct 12480
 5 gtctcgcatt agtagtttg atgtgggtgc tcattttcag catctagccg ccattgaagc 12540
 cgagacctgt aaatatttg cctcccggt gccatgcta cacaacctgc gcatgacagg 12600
 gtcaaatgta accatagtgt ataatagcac tttgaatcag gtgtttgcta tttttccaac 12660
 ccctggttcc cggccaaagc ttcattgatt tcagcaatgg ttaatagctg tacattcctc 12720
 catattttcc tctgttcag cttctgttac tctttttgtt gtgctgtggt tgcgggttcc 12780
 10 aatactacgt actgtttttg gtttccgctg gttaggggca atttttcttt cgaactcaca 12840
 gtgaattaca cgggtgtgct accttgctc acccggaag cagccacaga gatctacgaa 12900
 cccggtaggc ctctttgtg caggataggg tatgaccgat gtggggagga cgatcatgac 12960
 gagctagggt ttatgatacc gcctggcctc tccagcgaag gccacttgac tagtgtttac 13020
 gcctggttg cgttctgtc cttcagctac acggcccagt tccatcccga gatattcggg 13080
 15 atagggaaatg tgagtcgagt ttatgttgac atcaaacatc aactcatctg cgccgaacat 13140
 gacgggcaga acaccacctt gcctcgtcat gacaacattt cagccgtgtt tcagacctat 13200
 taccaacatc aagtcgacgg cggcaattgg tttcacctag aatggcttgc tcccttcttt 13260
 tcctcgtggt tggttttaaa tgtctcttg tttctcaggc gttcgcctgc aaacctatgtt 13320
 tcagttcgag tcttgcatg attagacca acaccaccgc agcggcaagc tttgctgtcc 13380
 20 tccaagacat cagttgcctt aggcacgcg actcggcctc tgaggcgatt cgcaaaatcc 13440
 ctcagtgccg tacggcgata gggacaccgc tgtatgttac catcacagcc aatgtgacag 13500
 atgagaatta ttacattct tctgatctcc tcatgcttcc ttcttgctt ttctatgctt 13560
 ctgagatgag tgaaaaggga ttttaagggtg tatttgcaa tgtgtcaggc atcgtggctg 13620
 tgtgtgtcaa tttaccagc tacgtccaac atgtcaagga gtttaccxaa cgctccctgg 13680
 25 tggtcgacca tgtgcggtt ctccatttca tgacacctga gaccatgagg tgggcaactg 13740
 ttttagcctg tctttttgcc attctgttg caatttgaat gtttaagcat gttggagaaa 13800
 tgcttgaccg cgggctgtt ctcgcgattg ctttcttgt ggtgtatcgt gccgttctgt 13860
 tttgctgtgc tcgccaacgc cagcaacgac agcagctccc atctacagct gatttacaac 13920
 ttgacgctat gtgagctgaa tggcacagat tggctagcta acaaatttga ttgggcagtg 13980
 30 gagagttttg tcatctttcc cgttttgact cacattgtct cctatggtgc cctcactacc 14040
 agccatttcc ttgacacagt cgctttagtc actgtgtcta ccgccgggtt tgttcacggg 14100
 cggtatgtcc taagtagcat ctacgcggtc tgtgccctgg ctgcgttgac ttgcttctgc 14160

	attaggtttg caaagaattg catgtcctgg cgctacgcgt gtaccagata taccaacttt	14220
	cttctggaca ctaagggcag actctatcgt tggcggtcgc ctgtcatcat agagaaaagg	14280
	ggcaaagtgt aggtcgaagg tcatctgacg gacctcaaaa gagttgtgct tgatggttcc	14340
	gtggcaaccc ctataaccag agtttcagcg gaacaatggg gtcgtcctta gatgacttct	14400
5	gtcatgatag cacggctcca caaaaggtgc ttttggcggt ttctattacc tacacgccag	14460
	tgatgatata tgccctaaag gtgagtcgcg gccgactgct agggcttctg caccttttga	14520
	tcttcctgaa ttgtgctttc accttcgggt acatgacttt cgcgactttt cagagtacaa	14580
	ataaggtcgc gctcactatg ggagcagtag ttgcactcct ttgggggggtg tactcagcca	14640
	tagaaacctg gaaattcatc acctccagat gccgtttgtg cttgctaggc cgcaagtaca	14700
10	ttctggcccc tgcccaccac gttgaaagtg ccgcaggctt tcatccgatt gcggcaaagt	14760
	ataaccacgc atttgtcgtc cggcgtcccg gctccactac ggtcaacggc acattggtgc	14820
	ccgggttaaa aagcctcgtg ttgggtggca gaaaagctgt taaacaggga gtggtaaacc	14880
	ttgtcaaata tgccaaataa caacggcaag cagcagaaga gaaagaaggg ggatggccag	14940
	ccagtcaatc agctgtgccg gatgctgggt aagatcatcg ctcagcaaaa ccagtccaga	15000
15	ggcaagggac cgggaaagaa aaataagaag aaaaaccgg agaagcccca ttttcttcta	15060
	gcgactgaag atgatgtcag acatcacttt acccctagtg agcggcaatt gtgtctgtcg	15120
	tcaatccaga ccgcctttaa tcaaggcgct gggacttgca ccctgtcaga ttcaggagg	15180
	ataagttaca ctgtggagtt tagtttgcct acgcatcata ctgtgcgcct gatccgcgtc	15240
	acagcatcac cctcagcatg atgggctggc attcttgagg catctcagtg tttgaattgg	15300
20	aagaatgtgt gggttaacggc actgattgac attgtgcctc taagtcacct attcaattag	15360
	ggcgaccgtg tgggggtgag atttaattgg cgagaaccat gcggccgaaa ttaaaaaaaaa	15420
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	15451
	<210>	18
	<211>	22
25	<212>	DNA
	<213>	sintética
	<400>	18
	gccaacagcg ccagcagctc tc	22
	<210>	19
30	<211>	24
	<212>	DNA
	<213>	sintética

	<400>	19		
			gttgatttac gccttgacgc tatg	24
	<210>	20		
	<211>	22		
5	<212>	DNA		
	<213>	sintética		
	<400>	20		
			gtgagctggc tggcacagat tg	22
	<210>	21		
10	<211>	53		
	<212>	DNA		
	<213>	sintética		
	<400>	21		
			gccaacagcg ccagcagctc tcattcttcag ttgatttacg ccttgacgct atg	53
15	<210>	22		
	<211>	45		
	<212>	DNA		
	<213>	sintética		
	<400>	22		
20			gttgatttac gccttgacgc tatgtgagct ggctggcaca gattg	45
	<210>	23		
	<211>	74		
	<212>	DNA		
	<213>	sintética		
25	<400>	23		
			gccaacagcg ccagcagctc tcattcttcag ttgatttaca acttgacgct atgtgagctg	60
			gctggcacag attg	74
	<210>	24		
	<211>	74		
30	<212>	DNA		
	<213>	sintética		
	<400>	24		

	gccaacagcg ccagcagctc tcattcttcag ttgatttacg ccttgacgct atgtgagctg	60
	gctggcacag attg	74
	<210> 25	
	<211> 24	
5	<212> DNA	
	<213> sintética	
	<400> 25	
	ctaccaacat caggtcgatg gcgg	24
	<210> 26	
10	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> sintética	
	<400> 26	
	gtcggccgcg acttaccttt agag	24

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo que codifica uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado e um veículo terapeuticamente aceitável.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de RNA de PRRSV da América do Norte infecciosa.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA de PRRSV da América do Norte infecciosa.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA em que um promotor ativo em células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica a dita variação de polipeptídeo de GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o dito promotor é um promotor de CMV.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito sítio de glicosilação ligado a N é inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o dito códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina codifica um resíduo de alanina ou de glutamina.

8. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito polinucleotídeo que codifica uma proteína variante do polipeptídeo de GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada em que ambos os ditos sítios de glicosilação ligados a N correspondendo à aspara-

gina 34 e à asparagina 51 na proteína GP5 de referência da América do Norte da SEQ ID NO: 1 estão inativados.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que ambos os ditos sítios de glicosilação ligados a N estão inativados através da substituição dos códons que codificam a dita asparagina 34 e a dita asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que os ditos códons que codificam um outro aminoácido codificam um resíduo de alanina ou de glutamina.

11. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que um dos ditos sítios de glicosilação ligados a N é inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 34 ou a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

12. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito veículo terapeuticamente aceitável é selecionado do grupo que consiste em uma proteína, um tampão, um tensoativo e um polímero de polietileno glicol ou qualquer combinação dos mesmos.

13. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita composição compreende ainda pelo menos um adjuvante.

14. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o dito adjuvante é selecionado do grupo que consiste em hidróxido de alumínio, Quil A, uma interrupção brusca em gel de alumina, óleos minerais, glicerídeos, ácidos graxos, subprodutos de ácidos graxos, micobactérias e oligodesoxinucleotídeos CpG ou qualquer combinação dos mesmos.

15. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a dita composição compreende ainda um segundo adjuvante que é selecionado do grupo que consiste em interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, interferon gama (g-IFN), fator de necrose celular, MDP

(muramil dipeptídeo), complexo imuno estimulante (ISCOM) e lipossomos.

16. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende um vetor viral selecionado do grupo que consiste em um vetor de vírus vaccinia, um vetor viral de herpes simplex, um vetor de adenovírus, um vetor de alfavírus e um vetor de TGEV.

17. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma variação do polipeptídeo de GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína consenso GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado e um veículo terapeuticamente aceitável.

18. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que codifica uma variação do polipeptídeo de GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado.

19. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que ambos sítios de glicosilação ligados a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 na SEQ ID NO: 1 estão inativados.

20. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de RNA de PRRSV da América do Norte infecciosa.

21. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA de PRRSV da América do Norte infecciosa.

22. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA em que um promotor ativo em células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica a dita variação de polipeptídeo de GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada.

23. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dito promotor é um promotor de CMV.

24. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 51 está inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

25. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o dito códon que codifica um outro aminoácido codifica um resíduo de alanina ou de glutamina.

26. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que um sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 34 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado.

27. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de ser através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 34 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

28. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o dito códon que codifica um outro aminoácido codifica um resíduo de alanina ou de glutamina.

29. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que um dos ditos sítios de glicosilação ligados a N está inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 34 ou a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

30. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende um vetor viral selecionado do grupo que consiste em um vetor de vírus vaccinia, um vetor viral de herpes simplex, um vetor de adenovírus, um vetor de alfavírus e um vetor de TGEV.

31. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de ser uma va-

riação de polipeptídeo de GP5 de PRRSV da América do Norte hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 51 em uma proteína de referência GP5 da SEQ ID NO: 1 está inativado.

5 32. Uso de um polinucleotídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 18 a 31, caracterizado pelo fato de que é na preparação de composição para ativação de uma resposta imunológica maior em um porco para um antígeno do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV).

10 33. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de RNA de PRRSV infecciosa.

15 34. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA que codifica uma molécula de RNA de PRRSV infecciosa.

35. Uso de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que a dita molécula de RNA de PRRSV infecciosa é um derivado de PRRSV da América do Norte ou um derivado de PRRSV da Europa.

20 36. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a dita molécula de RNA de PRRSV infecciosa é um derivado de PRRSV da América do Norte que codifica uma proteína variante do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada em que pelo menos um sítio de glicosilação ligado a N correspondendo à asparagina 34 ou à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 está inativado.

25 37. Uso de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o sítio de glicosilação ligado a N correspondente à asparagina 51 na SEQ ID NO: 1 está inativado.

30 38. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que ambos os ditos sítios de glicosilação ligados a N correspondendo à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 estão inativados.

39. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo

fato de que ambos os ditos sítios de glicosilação ligados a N estão inativados através da substituição dos códons que codificam a dita asparagina 34 e a dita asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina.

5 40. Uso de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que os ditos códons que codificam um outro aminoácido codificam um resíduo de alanina ou de glutamina.

 41. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que os ditos códons codificam um resíduo de alanina.

10 42. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende uma molécula de DNA em que um promotor ativo em células de mamíferos está ligado de forma operacional ao dito polinucleotídeo que codifica uma proteína GP5 hipoglicosilada.

 43. Uso de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo
15 fato de que o dito promotor é um promotor de CMV.

 44. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito sítio de glicosilação ligado a N está inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

20 45. Uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o dito códon que codifica um outro aminoácido codifica um resíduo de alanina ou de glutamina.

 46. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito sítio de glicosilação ligado a N que corresponde à asparagina 34 está inativado através da substituição de um códon que codifica a
25 dita asparagina 34 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

 47. Uso de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o dito códon que codifica um outro aminoácido codifica um resí-
30 duo de alanina ou de glutamina.

 48. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo codifica uma proteína variante do polipep-

tídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada em que ambos os ditos sítios de glicosilação ligados a N correspondentes à asparagina 34 e à asparagina 51 em uma proteína GP5 de referência da SEQ ID NO: 1 estão inativados.

49. Uso de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo
5 fato de que ambos os ditos sítios de glicosilação ligados a N estão inativados através da substituição dos códons que codificam a dita asparagina 34 e a dita asparagina 51 por códons que codificam um aminoácido sem ser a asparagina.

50. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo
10 fato de que os ditos códons que codificam um outro aminoácido codificam um resíduo de alanina ou de glutamina.

51. Uso de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo
fato de que um dos ditos sítios de glicosilação ligados a N está inativado através da substituição de um códon que codifica a dita asparagina 34 ou a
15 dita asparagina 51 por um códon que codifica um aminoácido sem ser a asparagina.

52. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo
fato de que a dita composição é administrada através de injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeção intradermal, injeção parenteral, injeção intramuscular, injeção sem agulha, eletroporação, fornecimento oral, fornecimento intranasal, fornecimento oronasal ou qualquer combinação dos mesmos.
20

53. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo
fato de que a dita composição compreende ainda um veículo terapeuticamente aceitável.
25

54. Uso de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo
fato de que o dito veículo é selecionado do grupo que consiste em uma proteína, um tampão, um tensoativo e um polímero de polietileno glicol ou qualquer combinação dos mesmos.

55. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo
30 fato de que a dita composição compreende ainda um adjuvante.

56. Uso de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo

fato de que o dito adjuvante é selecionado do grupo que consiste em hidróxido de alumínio, Quil A, uma interrupção brusca em gel de alumina, óleos minerais, glicerídeos, ácidos graxos, subprodutos de ácidos graxos, micobactérias e oligodesoxinucleotídeos CpG ou qualquer combinação dos
5 mesmos.

57. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende um vetor viral selecionado do grupo que consiste em um vetor de vírus vaccinia, um vetor viral de herpes simplex, um vetor de adenovírus, um vetor de alfavírus e um vetor de TGEV.

10 58. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a dita resposta imunológica aumentada do dito porco a um antígeno de PRRSV compreende uma maior produção de anticorpos neutralizadores de PRRSV pelo dito porco.

59. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo
15 fato de que o dito porco é uma porca, uma leitoa, um porco não castrado ou um leitão.

60. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo que codifica uma variação do polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada é obtido através da síntese direta, da mutagênese de uma sequência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV da
20 América do Norte ou de uma sequência de nucleotídeos de GP5 consenso de PRRSV da América do Norte.

61. Uso de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a dita sequência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV
25 da América do Norte codifica um peptídeo selecionado do grupo que consiste da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

62. Uso de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo
30 fato de que a dita sequência de nucleotídeos de GP5 de PRRSV da América do Norte consenso codifica uma proteína GP5 consenso que é pelo menos 85% idêntica à SEQ ID NO: 14.

63. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo que codifica uma variação de polipeptídeo GP5 de PRRSV hipoglicosilada é obtido através da síntese direta, da mutagênese de uma seqüência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV da Europa ou da mutagênese de uma seqüência de nucleotídeos de GP5 de PRRSV da Europa consenso.

64. Uso de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que a dita seqüência de nucleotídeos de GP5 do isolado de PRRSV da Europa codifica uma proteína GP5 que é pelo menos 85% idêntica à SEQ ID NO: 15.

65. Uso de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que a dita seqüência de nucleotídeos de GP5 de PRRSV da Europa é a SEQ ID NO: 15.

66. Uso de um polipeptídeo isolado como definido na reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição para ativação de uma resposta imunológica maior em um porco para um antígeno do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV).

FIG. 1A

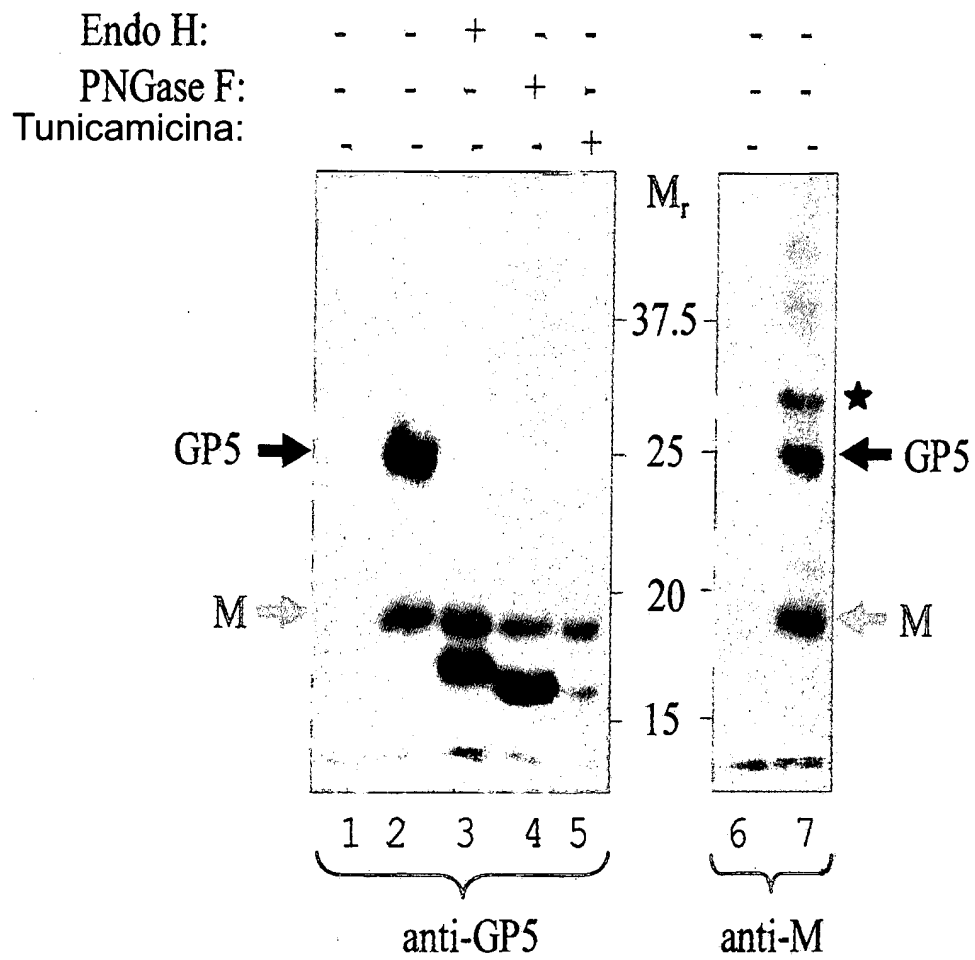


FIG. 1B

FIG. 2A

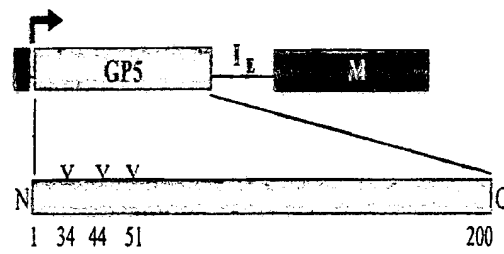


FIG. 2B

	<u>34</u>	<u>44</u>	<u>51</u>
GP5(wt)	N	N	N
N34A	A	N	N
N44A	N	A	N
N51A	N	N	A
N34/44A	A	A	N
N44/51A	N	A	A
N34/51A	A	N	A
N34/44/51A	A	A	A

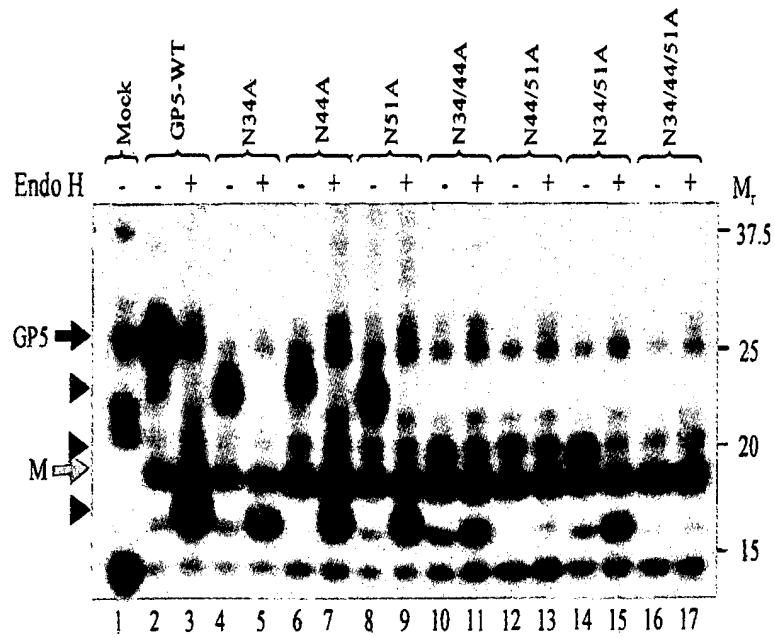


FIG. 2C

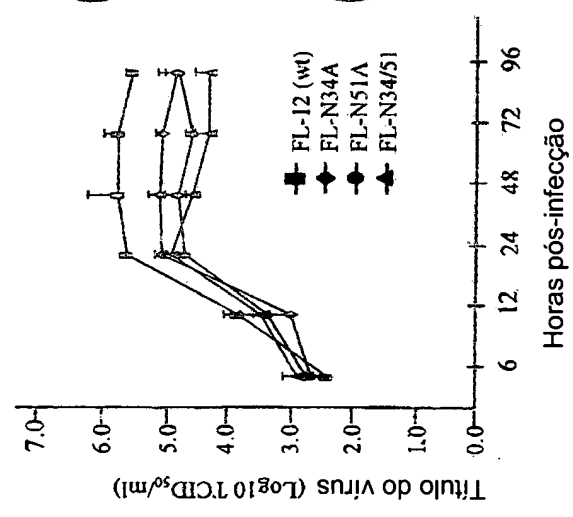


FIG. 3A

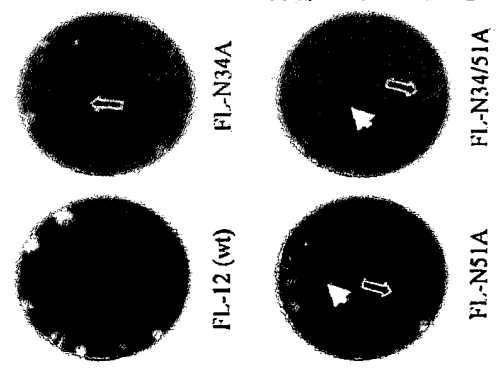


FIG. 3B

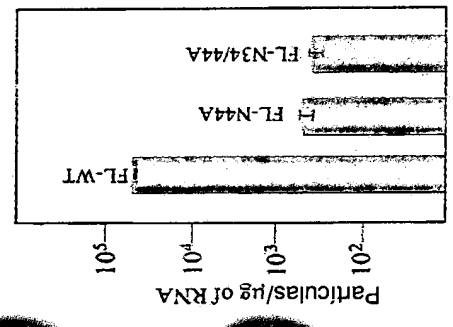


FIG. 3C

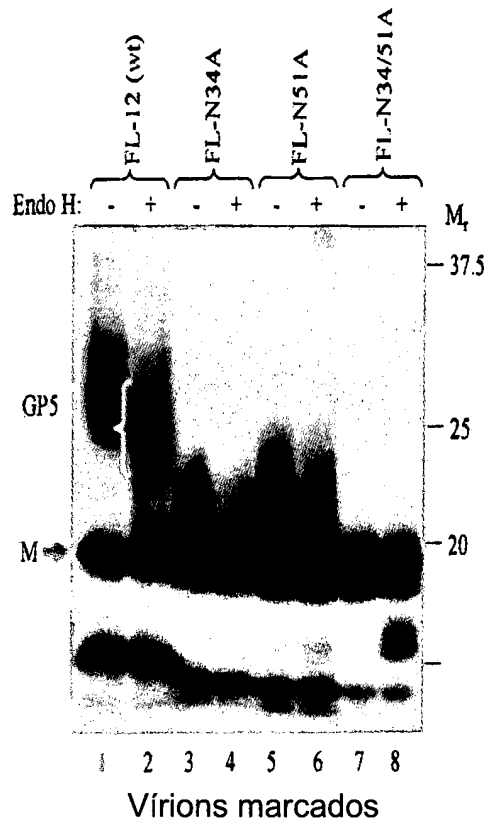


FIG. 4A

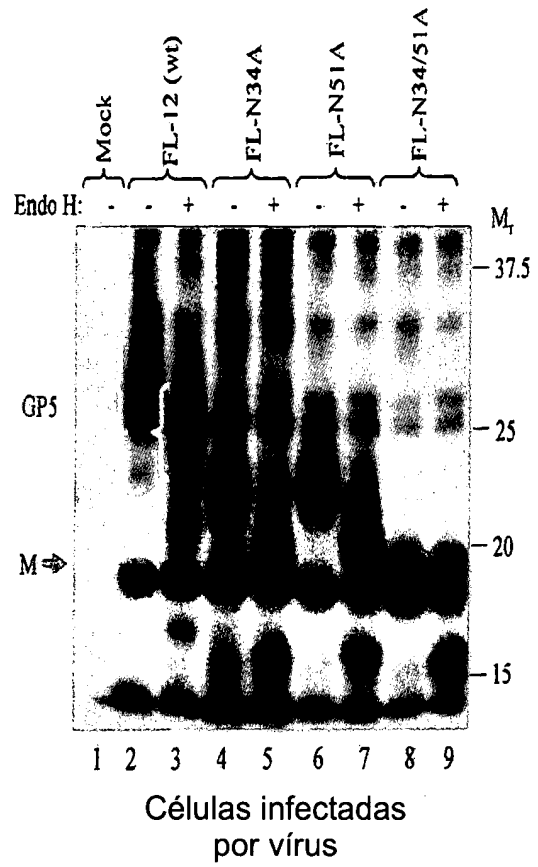


FIG. 4B

MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVN Maioria

10 20 30

+ + +

1 MLGRCLTAGCCSRLLSLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:1

1 MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:2

1 MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:3

1 MLGKCLTVGYCSQLPFLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:4

1 MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFVALVN SEQ ID NO:5

1 MLGKCLTAGCCSRLPFLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:6

1 MLGKCLTAGCCSRLPFLWCIVPFCFAVLVN SEQ ID NO:7

1 MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:8

1 MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVN SEQ ID NO:9

1 MLGKCLTAGCCSQLLFLWCIVPSWFVALVS SEQ ID NO:10

1 MLEKCLTAGCCSRLLSLWCIVPFCFAVLAN SEQ ID NO:11

1 MLGKCLTAGCCSQLLFLWCIVPSCFVALVS SEQ ID NO:12

1 MLEKCLTAGCCSQLLSLWCIVPFCFAVLAN SEQ ID NO:13

ASNNSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKDF Maioria

40 50 60

-----+-----+-----+-----

31 ANSNSSSHLQLIYNLTLCNELNGTDWLKDKF SEQ ID NO:1

31 ASSSSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNF SEQ ID NO:2

31 ASNNSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNF SEQ ID NO:3

31 ASSTSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKDF SEQ ID NO:4

31 ASNSSSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKDF SEQ ID NO:6

31 ASPNSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNARF SEQ ID NO:7

31 ASNNSSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKDF SEQ ID NO:8

31 ASSSSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNF SEQ ID NO:9

31 ASNSSSSSHLQLIYNLTLCNELNGTDWLADKF SEQ ID NO:10

31 ASNDSSSHLQLIYNLTLCNELNGTDWLANKF SEQ ID NO:11

31 ANGNSGSNLQLIYNLTLCNELNGTDWLANKF SEQ ID NO:12

31 ASNDSSSHLQLIYNLTLCNELNGTDWLANKF SEQ ID NO:13

FIG. 5

	M R C S H K L G R F L T A G S C S R L L S L L C I V P F C F	Maioria
	10 20 30	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
1	M - - - - L G R C L T A G C C S R L L S L W C I V P F C F	SEQ ID NO:1
1	M R C S H K L G R F L T P H S C F W W L F L L C - - - - -	SEQ ID NO:15
	A G L V W S F A A G S G S S S T L Q L I Y N L T L C E L N G	Maioria
	40 50 60	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
26	A A L V - - - N A N S N S S S H L Q L I Y N L T L C E L N G	SEQ ID NO:1
25	T G L S W S F A D G N G D S S T Y Q Y I Y N L T I C E L N G	SEQ ID NO:15
	T D W L S S K F G W A V E T F V L F P V A T H I V S L G A L	Maioria
	70 80 90	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
53	T D W L K D K F D W A V E T F V I F P V L T H I V S Y G A L	SEQ ID NO:1
55	T D W L S S H F G W A V E T F V L Y P V A T H I L S L G F L	SEQ ID NO:15
	T T S H F L D A V G L G A V S T A G F V G G R Y V L S S V Y	Maioria
	100 110 120	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
83	T T S H F L D T V G L V T V S T A G F Y H G R Y V L S S I Y	SEQ ID NO:1
85	T T S H F F D A L G L G A V S T A G F V G G R Y V L C S V Y	SEQ ID NO:15
	G A C A L A A L V C F V I R A A K N C M A W R Y A R T R F T	Maioria
	130 140 150	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
113	A V C A L A A L I C F V I R L A K N C M S W R Y S C T R Y T	SEQ ID NO:1
115	G A C A F A A F V C F V I R A A K N C M A C R Y A R T R F T	SEQ ID NO:15
	N F L V D T K G R V H R W K S P V V V E K G G K A E V D G N	Maioria
	160 170 180	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
143	N F L L D T K G R L Y R W R S P V I I E K G G K V E V E G H	SEQ ID NO:1
145	N F I V D D R G R V H R W K S P I V V E K L G K A E V D G N	SEQ ID NO:15
	L V T I K H V V L D G V V A T P L T R V S A E Q W G A L	Maioria
	190 200	
	- - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - +	
173	L I D L K R V V L D G S V A T P L T R V S A E Q W G R L	SEQ ID NO:1
175	L V T I K H V V L E G V K A Q P L T R T S A E Q W E A	SEQ ID NO:15

P.0015610-0

RESUMO

Patente de Invenção: "**PROCESSOS E COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO DE ANIMAIS COM ANTÍGENOS DE PRRSV COM MAIOR IMUNOGENICIDADE**".

- 5 Porcos desafiados com variações hipoglicosiladas da proteína GP5 principal de superfície do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV) exibiram maior produção de anticorpos neutralizadores de PRRSV em relação aos níveis de anticorpos neutralizadores produzidos por porcos imunizados com GP5 do tipo selvagem (wt) ou glicosilada. Esta in-
- 10 venção fornece processos de obtenção de respostas imunológicas maiores em porcos para o PRRSV, composições úteis para a obtenção de respostas imunológicas maiores assim como polinucleotídeos isolados que codificam variações hipoglicosiladas da proteína GP5 principal de superfície de PRRSV.