

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

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

(43) Data de publicação do pedido: **2008.11.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.02.19**
101/2014

(73) Titular(es):

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

(72) Inventor(es):

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

(74) Mandatário:

MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA
RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADAS À DOENÇA DO EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (DEL)**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A SEQUÊNCIA GENÓMICA E À CODIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS PARA OS POLIPÉPTIDOS DE CIRCOVÍRUS DEL, TAL COMO OS REFERIDOS POLIPÉPTIDOS NÃO ESTRUTURAIS E ESTRUTURAIS DE CIRCOVÍRUS E VECTORES QUE INCLUEM AS REFERIDAS SEQUENCIAS E CÉLULAS OU ANIMAIS TRANSFORMADOS PELOS REFERIDOS VECTORES. A INVENÇÃO REFERESE TAMBÉM A MÉTODOS PARA DETECÇÃO DOS REFERIDOS ÁCIDOS NUCLEICOS OU POLIPÉPTIDOS E KITS PARA DIAGNÓSTICO DE INFEÇÃO ATRAVÉS DE UM CIRCOVÍRUS DEL. A INVENÇÃO REFERE-SE TAMBÉM A UM MÉTODO PARA SELECIONAR COMPOSTOS CAPAZES DE MODULAR A INFEÇÃO VIRAL. FINALMENTE A INVENÇÃO REFERE-SE FARMACEUTICAMENTE, EM PARTICULAR A VACINAS, COMPOSIÇÕES PARA PREVENÇÃO E/OU TRATAR INFEÇÕES VIRAIS CAUSADAS POR CIRCOVÍRUS DEL E O USO DO REFERIDO VECTOR PARA PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE DOENÇAS POR TERAPIA GÉNICA.

RESUMO

SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADAS À DOENÇA DO EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (DEL)

A invenção refere-se a sequência genómica e à codificação de sequências nucleotídicas para os polipéptidos de circovírus DEL, tal como os referidos polipéptidos não estruturais e estruturais de circovírus e vectores que incluem as referidas sequências e células ou animais transformados pelos referidos vectores. A invenção refere-se também a métodos para detecção dos referidos ácidos nucleicos ou polipéptidos e kits para diagnóstico de infeção através de um circovírus DEL. A invenção refere-se também a um método para seleccionar compostos capazes de modular a infeção viral. Finalmente a invenção refere-se farmacêuticamente, em particular a vacinas, composições para prevenção e/ou tratar infecções virais causadas por circovírus DEL e o uso do referido vector para prevenção e/ou tratamento de doenças por terapia génica.

DESCRIÇÃO

**SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADAS À DOENÇA DO EMAGRECIMENTO
DO LEITÃO (DEL)**

A presente invenção inclui composições de vacina para a prevenção e/ou tratamento de infecção virai por circovírus. A descrição refere-se às sequências genómicas e sequências de nucleótidos que codifica os polipéptidos de circovírus DEL, tais como polipéptidos estruturais e não estruturais do referido circovírus, bem como vectores incluindo as referidas sequências e as células ou animais transformadas por estes vectores. A descrição também se refere a métodos de detecção destes ácidos nucleicos ou polipeptídeos e kits para o diagnóstico de infeção pelo circovírus DEL. A descrição compreende também um método de selecção de compostos capazes de modular a infeção viral. A descrição compreende a utilização de vector de acordo com a invenção para a prevenção e/ou tratamento de doenças por terapia génica.

A doença do emagrecimento do leitão (DEL) ou ainda denominada definhamento fatal do leitão (DFL) foi largamente descrita na América do Norte (Harding, J.C., 1997), e os autores apresentaram a existência de uma relação entre esta patologia e a presença de circovírus porcino (Daft, B. et al., 1996; Clark, E.G., 1997; Harding, J.C., 1997; Harding, J.C. e Clark, E.G., 1997; Nayar, G.P. et al., 1997). Um circovírus porcino já foi evidenciado em culturas celulares derivadas de porco estabelecidas em linhas e infectadas cronicamente (Tischer, I., 1986, 1988, 1995; Dulac, G.C., 1989; Edwards, S., 1994; Allan, G.M., 1995 e McNeilly, F., 1996). Este vírus, aquando da infeção experimental de leitões, não se revelou patogénico para o porco (Tischer, I., 1986, Horner,

G.W., 1991) e a sua sequência nucleotídica foi determinada e caracterizada (Tischer, I., 1982; Meehan, B.M. et al., 1997; Mankertz, A., 1997). O circovírus porcino, denominado vírus PCV, pertence ao género circovírus da família circoviridae (Murphy, F.A. et al., 1995) cujo virião possui um ADN circular de comprimento compreendido entre 1,7 e 2,3 kb, ADN que compreende 3 grelhas de leitura aberta (ORF1 a ORF3), que codifica para uma proteína de replicação REP implicada na fase de ignição e de terminação da replicação circular rolante (RCR) (Heyraud-Nitschke, F., et al., 1995; Harding, M.R. et al., 1993; Hanson, S.F. et al., 1995; Fontes, E.P.B. et al., 1994), que codifica para uma proteína da cápside (Boulton, L.H. et al., 1997; Hackland, A.F. et al., 1994; Chu. P.W.G. et al., 1993) e que codifica para uma proteína não estrutural dita de disseminação (Lazarowitz, S.G. et al., 1989).

Os autores da presente invenção notaram que as manifestações clínicas perceptíveis no porco e ligadas à infeção pelo circovírus DEL são muito individualizadas. Estas manifestações aparecem em geral em porcos de 8 a 12 semanas de idade, desmamados desde 4 a 8 semanas. Os primeiros sinais são a hipotonia sem que se possa falar de prostração. Rapidamente (48 horas), os flancos encovam, a linha dorsal desenha-se, os porcos "branqueiam". Estes sinais são acompanhados em geral de hipertermia, de anorexia e frequentemente de manifestações respiratórias (tosse, dispneia, polipneia). Podem igualmente aparecer diarreias transitórias. A fase do estado de doença dura cerca de um mês findo o qual as taxas de mortalidade variam de 5 a 20 %. A estas mortalidades é conveniente adicionar uma proporção variável de animais cadavéricos (5-10 %) que não apresentam

futuro económico. Deve notar-se que fora este estado crítico de final de pós-definhamento, não é visível qualquer anomalia nas criações. Em particular, a função de reprodução é perfeitamente mantida.

No plano epidemiológico, as primeiras manifestações desta patologia aparecem no início de 1995 no Leste do departamento de Cotes d'Armor em França, não podendo ser avaliado com precisão o número de criações afectadas devido à ausência de um método de diagnóstico específico em laboratório ou de dispositivo de vigilância epidemiológica da totalidade das cabeças de gado. Baseando tanto nos factos clínicos como nos resultados de exames necrópsicos fornecidos pelos veterinários, pode-se estimar este número em várias dezenas (80-100). O carácter contagioso da doença é fraco a moderado. São relatados casos fora da zona inicial e na sua maioria são posteriores à transferência de animais provenientes de criações que conhecem o problema. Em contrapartida, uma particularidade da doença é a sua forte remanência. Assim, as criações atingidas após um ano são ainda relevantes apesar da aplicação maciça de terapêuticas. As criações com expressão clínicas são recrutadas nas várias categorias de especialização (maternidade-engorda, pós-desmame-engorda) e são afectadas diferentes estruturas económicas. Por outro lado, os problemas aparecem mesmo nas criações onde as regras da zootecnia são respeitadas.

Foram realizados numerosos exames necrópsicos seja nas criações seja no laboratório. Os elementos da tabela de lesões são diversos. As lesões macroscópicas mais constantes são a pneumonia que se apresenta por vezes intersticial assim como uma hipertrofia dos gânglios linfáticos. As outras

lesões respeitam sobretudo as vísceras torácicas das quais se destacam especialmente a pericardite e a pleuresia. Mas são igualmente observadas artrites e úlceras gástricas. As lesões reveladas no exame histológico situam-se essencialmente ao nível pulmonar (pneumonia intersticial), dos gânglios (depleção linfóide dos nódulos linfáticos, células gigantes) e renal (glomerulonefrite, vascularite). Os agentes infecciosos foram objecto de aturadas investigações. A intervenção dos pestivírus e da doença de Aujeszky pode ser excluída. Os distúrbios aparecem nos rebanhos SRRS (Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos) seropositivos, mas o papel deste na génese dos distúrbios não pode ser estabelecido (a maioria das criações da Bretanha são SRRS seropositivos).

A publicação por Meehan et al. (1998) descreve as várias sequências de nucleotídeos e de aminoácidos cujo ORFs são descritos, em particular o ORF2

- A sequência AF055391 compreende uma sequência de 92 % idêntica à sequência de SEQ ID N° 15,
- A sequência AF055392 compreende uma sequência de 92 % idêntica à sequência de SEQ ID N° 15,
- A sequência AF055393 compreende uma sequência de 99 % idêntica à sequência de SEQ ID N° 15, e
- A sequência AF055394 compreende uma sequência de 98 % idêntica à sequência de SEQ ID No. 15.

No entanto, esta publicação não divulga uma vacina que compreende essas sequências.

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

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

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

Os distúrbios não podem ser tratados pelas terapêuticas existentes.

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

- a doença DEL é transmissível mas é pouco contagiosa,
- a sua origem etiológica é de natureza infecciosa e provavelmente viral,
- a doença DEL apresenta um carácter persistente nas criações atingidas.

Seguem-se consequências económicas consideráveis para as criações.

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

Por outro lado, permanece ainda desejado um tratamento eficaz, e bem tolerado das infecções com circovírus DEL, não estando hoje disponível qualquer vacina contra o circovírus DEL.

Tratando-se do circovírus DEL, dever-se-á provavelmente compreender o papel da defesa imunitária na fisiologia e a patologia da doença para desenvolver vacinas satisfatórias.

Uma informação mais ampla relativamente à biologia destas estirpes, as suas interações com os seus hospedeiros, os fenómenos de inactividade associados e especialmente aqueles de escape às defesas imunitárias do hospedeiro, e finalmente a sua implicação no desenvolvimento das patologias associadas, permitirá uma melhor compreensão destes mecanismos. Tendo em conta as considerações precedentes e que

ilustram em particular as limitações dos meios de luta contra a infeção pelo circovírus DEL, é então primordial hoje por um lado desenvolver ferramentas moleculares, especialmente a partir de um melhor conhecimento genético do circovírus DEL, mas igualmente otimizar novos tratamentos preventivos e terapêuticos, novos métodos de diagnóstico e novas estratégias de vacina específicas, eficazes e toleradas. Tal é precisamente o objecto da presente invenção.

A presente descrição refere-se às sequências nucleotídicas do genoma de circovírus DEL de sequências SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou um dos seus fragmentos.

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

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

A presente descrição refere-se também a sequências de nucleótidos caracterizada pelo facto de elas serem escolhidas a partir de:

- a) uma sequência de nucleótidos específica de um fragmento de SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, ID SEQ N° 10 ou um seu fragmento;

- b) uma sequência de nucleótidos que são homólogas a uma sequência de nucleótidos como definida em a);
- c) uma sequência de nucleótidos complementar a uma sequência de nucleótidos como definida em a) ou b), e a sua sequência de nucleótidos correspondente do ARN;
- d) uma sequência de nucleótidos capaz de hibridar sob condições rigorosas com uma sequência tal que definido em a), b) ou c);
- e) uma sequência de nucleótidos compreendendo uma sequência tal como definida em a), b), c) ou d); e
- f) uma sequência de nucleótidos modificados por uma sequência de nucleótidos tal como definido nas alíneas a), b), c), d) ou e).

Entende-se por sequência nucleotídica, polinucleotídica ou ácido nucleico, segundo a presente invenção, tanto um ADN de cadeia dupla ou de cadeia simples em formas monoméricas e diméricas (ditas em série) como produtos de transcrição dos referidos ADNs.

Deve ser entendido que a presente divulgação não se refere às sequências de nucleótidos genômicas tomadas no seu ambiente natural, isto é, no seu estado natural. Estas são sequências que foram isoladas, purificadas ou parcialmente purificada, a partir de tais métodos de separação como por exemplo a cromatografia de troca ião, por exclusão com base no tamanho molecular, ou por técnicas de afinidade, ou de fracionamento baseados sobre a solubilidade em diferentes solventes, ou a partir de métodos de engenharia genética, tais como amplificação, clonagem e subclonagem, as sequências de a descrição pode ser realizada por vectores.

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

Por fragmento de sequência nucleotídica, entende-se designar qualquer fragmento nucleotídico do circovírus DEL, do tipo A ou B, de crescimento de pelo menos 8 nucleótidos, de preferência pelo menos 12 nucleótidos, e ainda mais preferentemente pelo menos 20 nucleótidos consecutivos da sequência da qual é retirado.

Por fragmento específico de sequência nucleotídica, entende-se designar qualquer fragmento nucleotídico do circovírus DEL, do tipo A ou B, que apresenta, após alinhamento e comparação com os fragmentos correspondentes de circovírus porcinos conhecidos, pelo menos um nucleótido ou base de natureza diferente. Por exemplo, os fragmentos nucleotídicos específicos do circovírus DEL de tipo A podem facilmente ser determinados reportando à figura 3 da presente invenção na qual são evidenciados os nucleótidos ou as bases da sequência SEQ ID N° 1 (circopordfp) que são de natureza diferente, após alinhamento da referida sequência SEQ ID N° 1 com as duas outras sequências de circovírus porcino conhecidas (circopormeeh e circopormank).

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

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

Na presente descrição, entende-se designar por circovírus DEL, os circovírus associados à doença do emagrecimento do leitão (DEL) do tipo A (PCVA) ou do tipo B (PCVB), aqui de seguida definidas pela sua sequência genômica, assim como os circovírus cujas sequências nucleotídicas são homólogas às sequências de circovírus DEL do tipo A ou B, tais como especialmente os circovírus correspondentes a variantes do tipo A ou do tipo B.

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

Entende-se por hibridação nas condições de restringência com uma sequência nucleotídica segundo a invenção, uma hibridação

em condições de temperatura e de força iônica escolhidas de tal modo que elas permitem a manutenção da hibridação entre dois fragmentos de ADN complementares.

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

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

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

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

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

Descrevem-se aqui sequências nucleotídicas igualmente utilizáveis como iniciador ou sonda em métodos que permitem

obter as sequências homólogas, sendo estes métodos tais como a reacção em cadeia da polimerase (PCR), a clonagem e a sequenciação de ácido nucleico bem conhecidos pelos peritos na técnica.

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

Sequências de nucleótidos também preferidas de acordo com a descrição são capazes de modular, inibir ou induzir a expressão do gene de circovírus, e/ou capaz de modular o ciclo de replicação de circovírus para dentro da célula e/ou o organismo hospedeiro. Destina-se a denotar ciclo de replicação, invasão, proliferação de circovírus, e espalhar as células hospedeiras células hóspedes no organismo hospedeiro.

Entre as referidas sequências de nucleótidos de acordo com a descrição, as sequências da SEQ ID N° 3 é finalmente preferidos aqueles que correspondem a quadros de leitura aberta, chamada de sequências de ORF (ORF para "open reading frame"), e que codifica polipéptidos, tais como, por exemplo (ORF1), SEQ ID N° 4 (ORF2) e SEQ ID N° 5 (ORF3), respectivamente, correspondendo à sequência de nucleótidos entre as posições 47-985 em relação à posição determinada na sequência de nucleótidos SEQ ID N° 1, as posições 1723-1022 e 658 para as posições 38 em relação à posição na sequência de nucleótidos SEQ ID N° 2 (mostrado na orientação 3' → 5'), as extremidades ser incluídos, ou SEQ ID N° 11 (ORF'1), SEQ ID NO: 12 (ORF'2) e SEQ ID N° 13 (ORF'3) respectivamente

correspondentes às sequências entre as posições 51-995 em relação à posição determinada na sequência de nucleótidos SEQ ID N° 9, das posições 1734-1033 e 670-357 posições, sendo as posições determinadas em relação à posição de a sequência de nucleótidos de SEQ ID N° 10 (mostrado na orientação 3' → 5'), sendo as extremidades incluídas.

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

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

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

A presente descrição tem como objeto as sequências nucleotídicas de circovírus DEL, caracterizadas por serem escolhidas entre as sequências SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ

ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou um dos seus fragmentos.

A descrição refere-se também a sequências nucleotídicas caracterizadas pelo facto de compreender uma sequência de nucleótidos seleccionada a partir de:

- a) uma sequência nucleotídica SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, ID SEQ N° 13 ou um seu fragmento;
- b) um sequência de nucleótidos de fragmento específica de uma sequência tal como definida em a);
- c) uma sequência de nucleótidos homólogas que tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência tal como definida em a) ou b);
- d) uma sequência de nucleótidos complementar ou uma sequência de ARN correspondente à definida em a), b) ou c); e
- e) uma sequência de nucleótidos modificados por uma sequência tal como definida em a), b), c) ou d).

No que respeita a homologia com as sequências nucleotídicas SEQ ID N° 3,

SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou um dos seus fragmentos, preferem-se as sequências homólogas, especialmente específicas, que apresentem uma percentagem de identidade com uma das sequências SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou um dos seus fragmentos de pelo menos 80 %, de preferência 90 % e 95 %. As referidas sequências homólogas específicas podem compreender, por exemplo, as sequências

correspondentes às sequências ORF1, ORF2, ORF3, ORF'1, ORF'2 e ORF'3 de variante de circovírus DEL do tipo A o do tipo B. Estas sequências homólogas específicas podem do mesmo modo corresponder a variações ligadas a mutações no seio das estirpes de circovírus DEL do tipo A ou do tipo B e corresponder especialmente a truncagens, substituições, deleções e/ou adições de pelo menos um nucleótido.

Entre as sequências de nucleótidos de acordo com a descrição, são especialmente preferidos a sequência SEQ ID N° 11, que tem homologia com mais de 80 % de identidade com a sequência SEQ ID n° 3 e SEQ ID No. 12.

De preferência, a descrição refere-se às sequências de nucleótidos de acordo com a descrição, caracterizados pelo facto de compreender uma sequência de nucleótidos seleccionada entre as seguintes sequências:

- a) 170 5'TGTGGCGA 3';
- b) 450 5' AGTTTCCT 3';
- c) 1026 5' TCATTTAGAGGGTCTTTCAG 3';
- d) 1074 5' GTCAACCT 3';
- e) 1101 5' GTGGTTGC 3';
- f) 1123 5' AGCCCAGG 3';
- g) 1 192 5' TTGGCTGG 3';
- h) 1218 5' TCTAGCTCTGGT 3';
- i) 1501 5' ATCTCAGCTCGT 3';
- j) 1536 5' TGCCTCCTCTT 3';
- k) 1563 5' TCTCTAGA 3';
- l) 1632 5' TGTACCAA 3';
- m) 5 1686' TCCGTCTT 3'; e sua sequência complementar.

A lista de sequências de nucleótidos a)-m) acima, os nucleótidos sublinhados são mutantes em comparação com os dois conhecidos, não patogénico para as sequências de circovírus suíno. O número que precede a sequência de nucleótidos que representa a posição da referida primeira sequência de nucleótidos com a sequência SEQ ID n° 1.

A presente invenção refere-se a uma composição de vacina, caracterizado pelo facto de compreender um polipéptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 12 e que corresponde a ORF '2 um circovírus DEL do tipo B.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina, caracterizado pelo facto de compreender um polipéptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 12, que corresponde à ORF'2 um circovírus DEL do tipo B.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina, caracterizado pelo facto de compreender uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15 e a correspondente ORF'2 um circovírus DEL do tipo B.

A invenção também se refere a uma composição de vacina, caracterizado pelo facto de compreender uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 95% de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15 e que corresponde a um ORF'2 circovírus do tipo B. A descrição compreende os polipéptidos codificados por uma sequência nucleotídica segundo a invenção, de preferência um polipéptido cujas sequência é

representada por um fragmento, especialmente específico, de uma das 6 sequências de aminoácidos representados pela figura 2, podendo estas 6 sequências de aminoácidos correspondentes aos polipéptidos ser codificados através de um dos 3 quadros de leitura possíveis da sequência SEQ ID N° 1 ou da sequência SEQ ID N° 2, ou um polipéptido cuja sequência é representada por um fragmento de aminoácidos correspondente aos polipéptidos podendo ser codificados segundo um dos 3 quadros de leitura possíveis da sequência SEQ IB N° 9 ou de sequência SEQ ID N° 10.

A invenção refere-se a polipéptidos caracterizados pelo facto de conterem um polipéptido de sequência de aminoácidos SEQ ID N° 15 SEQ.

A descrição refere-se a polipéptidos caracterizados por compreenderem um polipéptido escolhido entre as sequências de aminoácidos SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16 ou um dos seus fragmentos, ou um fragmento do polipéptido de sequência SEQ ID N° 15.

Entre os polipéptidos de acordo com a descrição, incluindo o polipeptídeo preferido de sequência de aminoácidos de SEQ ID No. 14 que tem homologia com mais de 80% de identidade com a sequência SEQ ID N° 6, e a sequência polipeptídica de SEQ ID NO: 15.

A descrição também se refere a polipéptidos caracterizados pelo facto de conterem um polipéptido seleccionado a partir de:

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

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina compreendendo uma sequência de polipeptídeo isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15 e que corresponde a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B caracterizado por a referida sequência inclui a sequência SEQ ID No. 17.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina compreendendo uma sequência de polipeptídeo isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15 e que corresponde a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B caracterizado por a referida sequência inclui a sequência SEQ ID N° 18.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina compreendendo uma sequência de polipeptídeo isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15 e que corresponde a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B caracterizado por a referida sequência inclui a sequência SEQ ID N° 19.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina compreendendo uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15 e que corresponde a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B caracterizado por a referida sequência inclui a sequência SEQ ID No. 20.

Descrevem-se ainda aqui os polipéptidos de sequências de aminoácidos SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20, sendo estes polipéptidos especialmente capazes de reconhecer de modo específico os anticorpos produzidos aquando da infeção pelo circovírus DEL do tipo B. Estes polipéptidos apresentam assim epítomos específicos do circovírus DEL do tipo B e podem então em particular ser utilizados no domínio diagnóstico ou como agente imunogénico para conferir uma protecção no porco contra a infeção pelo circovírus DEL, especialmente do tipo B.

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

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

Por fragmento de polipéptido, entende-se designar um polipéptido incluindo pelo menos 5 aminoácidos, de preferência 10 aminoácidos e 15 aminoácidos.

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

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

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

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

Estes aminoácidos equivalentes podem ser determinados seja com base na sua homologia de estrutura com os aminoácidos que

substituem, ou com base em resultados de ensaios comparativos de actividade biológica entre os diferentes polipéptidos susceptíveis de serem efectuados.

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

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

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

- capaz de induzir uma reacção de imunogenicidade dirigida contra um circovírus DEL; e/ou
- capaz de ser reconhecido por um anticorpo específico de um polipéptido segundo a invenção; e/ou

- capaz de se ligar a um polipéptido ou a uma sequência nucleotídica de circovírus DEL; e/ou
- capaz de exercer uma actividade fisiológica, mesmo parcial, tal como por exemplo uma actividade de disseminação ou estrutural (cápside); e/ou
- capaz de modular, de induzir ou de inibir a expressão do gene de circovírus DEL ou de uma das suas variantes, e/ou capaz de modular o ciclo de replicação DEL na célula e/ou o organismo hospedeiro.

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

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

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

Como é indicado, as modificações do polipéptido terão como objectivo especialmente:

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

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

Os polipéptidos modificados precedentes podem ser obtidos utilizando a química combinatória, na qual é possível fazer

variar sistematicamente partes de polipéptido antes de as testar em modelos, por exemplo culturas celulares ou microrganismos, para seleccionar os compostos mais activos ou que apresentam as propriedades procuradas.

A síntese química apresenta igualmente a vantagem de poder utilizar:

- aminoácidos não naturais, ou
- ligações não peptídicas.

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

Finalmente, a estrutura dos polipéptidos segundo a invenção, as suas formas homólogas específicas ou modificadas, poderá ser integrada nas estruturas químicas do tipo polipeptídico ou outros. Assim, poderá ser interessante de prever nas extremidades Net C-terminais compostos não reconhecidos pelas protéases.

Faz igualmente parte da descrição as sequências nucleotídicas codificadas por um polipeptídico de acordo com a invenção.

A descrição refere-se também a sequências de nucleótidos utilizadas como iniciador ou sonda, caracterizado em que as referidas sequências são seleccionados a partir das sequências de nucleótidos de acordo com a descrição.

Entre os pares de sequências de nucleótidos que podem ser usadas como um par de iniciadores de acordo com a descrição, prefere pares de iniciadores seleccionados de entre os seguintes pares:

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

A clonagem e sequenciamento do circovírus DEL, tipo A e B, foram identificados após a análise com as sequências de nucleotídeos de outros circovírus suíno, que estavam entre as sequências de fragmentos estes ácidos nucleicos, que são estritamente específicos para os circovírus DEL de tipo A, tipo B e tipo A e B, e os que correspondem a uma sequência de consenso de diferentes do tipo de circovírus circovírus porcino A e/ou B.

Uma grande necessidade existe também ter sequências nucleotídicas disponíveis para utilização como iniciador ou sonda específica para a totalidade do circovírus porcino e outros conhecidos não patogénico.

As referidas sequências de nucleótidos de consenso específicas de todos os outros que circovírus do tipo A e B

circovírus, são facilmente identificáveis a partir da Figura 3 e SEQ ID N° 9, e são parte da descrição.

Entre estas sequências de nucleótidos de consenso referidas, caracterizado pelo facto de que é preferível que faz parte do par de iniciadores seguinte:

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

A descrição também inclui uma sequência de nucleótidos de acordo com a descrição, caracterizado pelo facto que a referida sequência é uma sequência consenso específico de circovírus suíno diferente circovírus DEL do tipo B e é um dos iniciadores da seguinte par de iniciadores:

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

Entende-se que a presente descrição também se refere a polipéptidos circovírus específicos suíno conhecida, diferente de circovírus, codificado pela dita sequência de consenso de nucleótidos que pode ser obtida por purificação a partir de polipéptidos naturais, por recombinação genética ou por síntese química bem conhecido dos peritos na arte e tal como descrito abaixo, em particular os processos. Do mesmo modo, os anticorpos anticorpos mono-ou policlonais, marcados ou não rotulados, dirigidos contra os referidos polipéptidos específicos codificados pela referida sequências de nucleotídeos de consenso também fazem parte da descrição.

Tais sequências de nucleotídeos de consenso, as referidas correspondente disse anticorpos e polipeptídeos dirigidos contra os referidos polipéptidos, pode ser utilizada em métodos ou estojos de detecção e/ou identificação como descrito abaixo, em vez de ou em adição às sequências nucleotídicas, polipéptidos ou anticorpos de acordo com a descrição, para os tipos específicos circovírus A e/ou B.

Estes protocolos foram melhorados para detectar formas diferencialmente monoméricas circulares de formas replicativas específicas ou viriões ou de ADN em replicação nas formas encontradas nas referidas construções diméricas moleculares em tandem.

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

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

Os iniciadores oligodesoxiribonucleótidos ou oligoribonucleótidos, de preferência têm um comprimento de, pelo menos, 8 nucleótidos de preferência pelo menos 12 nucleótidos, e ainda mais preferencialmente pelo menos 20 nucleótidos.

Outras técnicas para a amplificação do ácido nucleico alvo pode ser vantajosamente utilizado como alternativas ao PCR.

As sequências de nucleótidos da descrição, em particular os iniciadores tal como descrito, podem também ser utilizado em outros processos para a amplificação de um ácido nucleico alvo, tais como:

- a técnica TAS (Transcription-based Amplification System), descrita por Kwok et al. en 1989;
- a técnica 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), descrita por Guatelli et al. en 1990;
- a técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), descrita par Kievitis et al. en 1991 ;
- a técnica SDA (Strand Displacement Amplification) ou técnica d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992);
- a técnica TMA (Transcription Mediated Amplification).

Os polinucleídeos da divulgação podem também ser utilizadas em técnicas de amplificação ou modificação do ácido nucleico que serve como sonda, tais como:

- a técnica LCR (Ligase Chain Reaction), descrita por Landegren et al. en 1988 et perfectionnée par Barany et al. en 1991, qui emploie une ligase thermostable;
- a técnica de RCR (Repair Chain Reaction), descrita por Segev en 1992 ;
- a técnica CPR (Cycling Probe Reaction), descrita por Duck et al. en 1990 ;

- a técnica d'amplification à la Q-beta-réplicase, descrita por Miele et al. en 1983 et perfectionnée notamment par Chu et al. en 1986, Lizardi et al. en 1988, puis par Burg et al., ainsi que par Stone et al. en 1996.

No caso em que o polinucleótido alvo pode ser detectado é um ARN, por exemplo ARNm, é possível usar, antes da implementação de uma reação de amplificação utilizando pelo menos uma cartilha de acordo com descrição ou a implementação de um método de detecção usando pelo menos uma sonda da descrição, enzima do tipo transcriptase reversa, a fim de se obter um ADNc a partir do ARN contido na amostra biológica. O cADN obtido irá então servir como alvo para os iniciadores ou a sonda ou utilizado no método amplificação ou detecção, tal de acordo com a descrição.

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

A descrição também inclui sequências de nucleótidos utilizadas como uma sonda ou iniciador de acordo com a descrição, caracterizado pelo facto de serem marcados com um composto radioactivo ou com um composto não radioactivo.

As sequências de nucleótidos que podem ser não marcados utilizados directamente como sondas ou iniciadores, no entanto, as sequências são geralmente marcado com um elemento radioactivo (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) ou por uma molécula não radioactiva (biotina, acetilaminofluoreno, digoxigenina, 5-

bromodesoxiuridina, fluoresceína) para se obter sondas adequadas para muitas aplicações.

Exemplos de etiquetagem não radioactiva de sequências de nucleótidos encontram-se descritos, por exemplo, na Patente Francesa No. 78,10975 ou por Urdea et al. ou por Sanchez-Pescador et al. 1988.

Neste caso, pode-se também utilizar qualquer um dos métodos de marcação descritos em patentes FR-2422956 e FR 2518755.

A técnica de hibridação pode ser realizada de diversas maneiras (Matthews et al. 1988). O método mais geral consiste em imobilizar o extracto de ácido nucleico de células sobre um suporte (por exemplo, nitrocelulose, nylon, poliestireno) e incubadas sob condições definidas, o ácido nucleico alvo imobilizado com a sonda. Depois a hibridação, o excesso de sonda é removida e as moléculas híbridas formadas são detectadas por um método apropriado (Medição da radioactividade, da fluorescência ou da actividade enzimática ligada à sonda).

A descrição compreende também as sequências de nucleótidos de acordo com a descrição, caracterizado pelo facto de serem imobilizadas sobre um suporte, covalente ou não covalente.

De acordo com um outro modo vantajoso de execução das sequências de nucleótidos de acordo com a descrição, estes Este último pode ser utilizado imobilizada sobre um suporte e, assim, servir para capturar, por hibridação específica de ácido alvo nucleico obtido a partir da amostra biológica a ser testada. Se necessário, o suporte sólido é separado da

amostra e o complexo formado entre a hibridação da referida sonda de captura e do ácido nucleico alvo é em seguida detetada usando uma segunda sonda, chamada sonda de revelação, marcado com um elemento facilmente detetável.

A presente invenção refere-se também a uma composição de vacina compreendendo um vector para a expressão de um polipéptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 90% de identidade com a sequência SEQ ID N° 12, que corresponde à 'ORF'2 um circovírus DEL do tipo B.

Um outro objectivo da presente descrição é um vector de clonagem e/ou expressão de uma sequência, caracterizada pelo facto de conter uma sequência de nucleótidos de acordo com a descrição.

Outro objectivo da presente descrição é um vector de clonagem e/ou expressão de uma sequência, caracterizada pelo facto de conter uma sequência de nucleótidos de acordo com a descrição.

Os vectores segundo a descrição, caracterizados por incluírem os elementos que permitem a expressão e/ou a secreção das referidas sequências nucleotídicas numa determinada célula hospedeira, são igualmente parte da descrição.

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

traduzida. Estes diferentes elementos são escolhidos em função do hospedeiro celular utilizado. Para este efeito, as sequências nucleotídicas segundo a invenção podem ser inseridos em vectores com replicação autónoma no seio do hospedeiro escolhido, ou de vectores integrativos do hospedeiro escolhido.

Tais vectores são preparados segundo os métodos correntemente utilizados pelo perito na técnica, e os clones que resultam poderão ser introduzidos num hospedeiro apropriado pelos métodos convencionais, tais como por exemplo a lipofecção, a electroporação, o choque térmico.

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

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

Um vector preferido para a expressão dos polipéptidos da invenção é o baculovírus.

Pode-se igualmente citar o vector pBS KS no qual é inserida a sequência de ADN em série do circovírus DEL do tipo A (ou DFP) e tal como depositado na CNCM a 3 de Julho de 1997, com o número 1-1891.

Estes vectores são úteis para transformar células hospedeiras de modo a clonar ou expressar as sequências nucleotídicas da descrição.

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

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

O hospedeiro celular pode ser escolhido entre sistemas procarióticos ou eucarióticos, como por exemplo as células bacterianas (Olins e Lee, 1993), mas igualmente as células de levedura (Buckholz, 1993), mesmo células animais, em particular as culturas de células de mamíferos (Edwards e Aruffo, 1993), e especialmente as células de ovário de hamster chinês (CHO), mas igualmente as células de insecto nas quais se podem utilizar os procedimentos que empregam por exemplo os baculovirus (Luckow, 1993).

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

Pode-se citar ainda *E. coli*, tal como depositada na CNCM a 3 de Julho de 1997, sob o número I-1891.

A descrição refere-se igualmente aos animais, compreendendo uma das referidas células transformadas segundo a descrição.

A obtenção de animais transgénicos segundo a invenção que sobre-expressam um ou vários genes de circovirus DEL ou parte dos genes será levada a cabo de forma preferida em ratos, ratinhos ou coelhos segundo métodos bem conhecidos pelo

perito na técnica tais como por transfecções, virais ou não virais. Os animais transgénicos que sobre-expressam um ou vários dos referidos genes poderão ser obtidos por transfecção de cópias múltiplas dos referidos genes sob o controlo de um promotor que possua uma natureza ubíqua, ou selectivo de um tipo de tecido. Os animais transgénicos poderão ser igualmente obtidos por recombinação homóloga em células estaminais embrionárias, transferência destas células estaminais para embriões, selecção de quimeras afectadas ao nível das linhagens reprodutoras, e crescimento das referidas quimeras.

As células transformadas assim como os animais transgénicos podem ser utilizados nos processos de preparação do polipéptido recombinante.

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

Os procedimentos de preparação de um polipéptido sob forma recombinante, caracterizados por utilizarem um vector e/ou uma célula transformada por um vector e/ou um animal transgénico que inclui as referidas células transformadas de acordo com a descrição, são por sua vez incluídas na presente descrição.

Entre os referidos procedimentos de preparação de um polipéptido sob a forma recombinante, podem citar-se em particular os processos de preparação que utilizam um vector

e/ou uma célula transformada pelo referido vector e/ou um animal transgénico que inclui uma das referidas células transformadas, contendo uma sequência nucleotídica segundo a invenção que codifica para um polipéptido de circovírus DEL.

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

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

Mais particularmente, descreve-se um processo para a preparação de um polipéptido que inclui as etapas seguintes:

- a) cultura das células transformadas em condições que permitem a expressão de um polipéptido recombinante de sequência nucleotídica de acordo com a descrição;
- b) sendo o caso, recuperação do referido polipéptido recombinante.

Quando o processo de preparação de um polipéptido envolve um animal transgénico segundo a invenção, o polipéptido recombinante é seguidamente extraído do referido animal.

A descrição também se refere a um polipeptídeo obtido por um método da descrição, como descrito acima.

A descrição também inclui um método para a preparação de um polipéptido sintético, caracterizado pelo facto de que usa uma sequência de aminoácidos dos polipeptídeos de acordo com a descrição.

A descrição também se refere a um polipeptídeo sintético obtido por um método, tal como descrito.

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

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

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

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

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

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

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

Tal determinante pode compreender um polipéptido de acordo com a descrição na forma glicosilada usada para se obter composições imunogénicas susceptíveis de induzir a síntese de anticorpos contra epitopos múltiplos. Polipéptidos referidos ou os seus fragmentos glicosiladas também fazem parte da descrição.

Estas moléculas híbridas podem consistir em parte de uma molécula transportadora de polipéptido ou seus fragmentos, como descrito, associado a uma parte imunogénica possivelmente, em particular, um epitopo da toxina da difteria, toxina do tétano, um antigénio de superfície o vírus da hepatite B (patente FR 79 21811), o antigénio de VP1 do vírus da poliomielite ou qualquer outra toxina ou antigénio virai ou bacteriana.

Os processos para a síntese de moléculas híbridas compreendem os métodos utilizados em engenharia genética para construir sequências de nucleótidos que codificam as sequências híbridas de polipeptídeos. Ele pode, por exemplo, referir-se, vantajosamente, com a técnica para a produção de genes que codificam as proteínas de fusão descritas por Minton, em 1984.

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

A descrição compreende também os vectores caracterizados pelo facto de conter uma das ditas sequências nucleotídicas híbridas. As células hospedeiras transformadas com os referidos vectores, o animal transgénico, compreendendo uma das referidas transformadas e os métodos de preparação de polipeptídeos recombinantes utilizando os referidos vectores, das referidas células transformadas e/ou as referidas células

de animais transgénicos são, claro, também parte da descrição.

Os polipéptidos de acordo com a descrição, os anticorpos tal como descrito abaixo e as sequências de nucleótidos descritas como descrito pode ser vantajosamente utilizado em métodos para a detecção e/ou identificação de circovírus, ou circovírus com excepção de uma amostra biológica (tecido ou fluido biológico) que podem conter eles circovírus suíno. Estes métodos, de acordo com a especificidade dos polipéptidos, anticorpos e sequências de nucleótidos de acordo com a descrição que irá ser utilizado, pode, em particular, detectar e/ou identificar um circovírus ou um mapa diferente de um circovírus suíno ou circovírus DEL com excepção de circovírus do tipo B.

Os polipéptidos de acordo com a descrição pode ser vantajosamente utilizada num método para a detecção e/ou identificação do tipo de circovírus A, tipo B, tipo A ou B, de outros que circovírus circovírus porcino DEL tipo B, ou outros que circovírus tipo A ou B circovírus porcino, em uma amostra biológica (tecido ou fluido biológico) que pode contê-los, caracterizado pelo facto de compreender os passos seguintes:

- a) o contacto da referida amostra biológica com um polipéptido ou um fragmento deste tal como descrito (sob condições que permitam uma reacção imunológica entre o referido polipéptido e os anticorpos possivelmente presentes na amostra biológica);

b) a identificação dos complexos possivelmente formada antígeno-anticorpo.

Na presente descrição, destina-se a denotar circovírus DEL, salvo menção especial é dada, um circovírus DEL de tipo A ou B, e o circovírus porcino excepto DEL, salvo menção especial é dada, um circovírus suíno que não seja um circovírus DEL do tipo A e B.

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

Qualquer procedimento convencional podem ser implementadas para alcançar tal detecção complexos antígeno-anticorpo possivelmente formados.

Por exemplo, um método preferido põe em jogo processos imunoenzimáticos de acordo com a técnica de ELISA, por imunofluorescência, ou lógica de radioimunoensaio (RIA) ou equivalente.

Assim, a descrição refere-se também aos polipéptidos de acordo com a descrição, marcado com um marcador adequado, tal como enzimas, fluorescente, radioactivo.

Tais métodos incluem, por exemplo, os seguintes passos:

- depósito de quantidades determinadas de uma composição polipeptídica, tal como descrito nas cavidades de uma placa microtitulação

- introdução nas referidas cavidades de diluições crescentes do soro, ou outra amostra biológica, tal como definida acima, para ser analisada,
- incubação da microplaca
- introdução para os poços da placa de microtitulação de anticorpos marcados dirigidos contra imunoglobulinas de porco, a rotulagem de estes anticorpos terem sido realizados usando uma enzima seleccionado entre aqueles que são capazes de hidrolisar um substrato modificando a absorção de radiação deste último, pelo menos, num comprimento de onda determinado, por exemplo, a 550 nm,
- detectar, por comparação com uma lâmpada de controlo, a quantidade de substrato hidrolisada.

A descrição também se refere a um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus DEL, circovírus porcino excepto circovírus ou outros tipo de circovírus B, caracterizado pelo facto de circovírus porcino que inclui os seguintes elementos:

- um polipeptídeo de acordo com a descrição,
- eventualmente, os reagentes para constituir o meio adequado para a reacção imuno lógica ou específica,
- eventualmente, os reagentes para a detecção de complexos antígeno-anticorpo produzido pela reacção imunológica entre o ou polipéptidos da descrição e os anticorpos possivelmente presentes na amostra biológica, tais reagentes podem também conter um marcador, ou ser capaz de ser reconhecida por sua vez por um reagente marcado, mais particularmente no caso em que o polipeptídeo de descrição não está marcado,

- se for o caso, uma referência amostra biológica (controlo negativo) sem anticorpos reconhecidos por um polipeptídeo de acordo com a descrição,
- se for caso disso, uma amostra biológica de referência (testemunha positiva) contendo uma quantidade predeterminada de anticorpos reconhecidos por um polipéptido de acordo com a quantidade de descrição.

Os polipéptidos de acordo com a descrição utilizada para preparar anticorpos monoclonais ou policlonais caracterizados em que eles reconhecem especificamente os polipéptidos de acordo com a invenção. O anticorpo monoclonal pode ser vantajosamente preparado a partir de hibridomas de acordo com a técnica descrita por Kohler e Milstein em 1975. Anticorpos policlonais podem ser preparados, por exemplo, através da imunização de um animal, em particular um ratinho, com um polipéptido de acordo invenção ou um ADN, tal como descrito, associado a um adjuvante da resposta imunitária, e em seguida, a purificação dos anticorpos específicos contidos no soro dos animais imunizados numa coluna de afinidade em que foi previamente ligado ao antigénio de polipéptido utilizado. Os anticorpos policlonais de acordo com a descrição, também pode ser preparado por purificação, numa coluna de afinidade em que foi previamente imobilizada polipéptido tal como descrito, os anticorpos contidos no soro de um suíno infectado por um circovírus DEL.

A descrição também se refere a anticorpos mono-ou policlonais ou seus fragmentos, ou anticorpos quiméricos, caracterizado pelo facto de que eles são capazes de reconhecer especificamente um polipéptido de acordo com a descrição.

Os anticorpos da especificação também pode ser marcada da mesma maneira como descrito anteriormente para as sondas nucleicos da descrição, como uma enzima de marcação, fluorescente ou radioactivo.

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

a) contactar a amostra biológica (tecido ou fluido biológico) com uma mono-ou policlonais, como descrito (sob condições que permitam uma reacção imunológica entre os referidos anticorpos e os polipéptidos de circovírus DEL, de circovírus porcino outro que não um circovírus DEL, de circovírus porcino outro que não circovírus DEL do tipo B, possivelmente presentes na amostra biológica);

b) a identificação do complexo antigénio-anticorpo pode ser formado.

Também dentro do âmbito da descrição, um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus DEL, de circovírus porcino outro que não um circovírus DEL ou o circovírus porcino outro que não o circovírus DEL de tipo B, caracterizado pelo facto de compreender os seguintes elementos:

- Um anticorpo monoclonal ou policlonal de acordo com a descrição, se apropriado colocado;
- Se for caso disso, um reagente para constituir o meio adequado para realizar a reacção imunológica;

- Se for caso disso, um reagente para a detecção de complexos antígeno-anticorpo produzidos pela reacção imunológica, este reagente pode também conter um marcador, ou ser capaz de ser reconhecida por sua vez, por um reagente marcado, mais particularmente no caso em que dito anticorpo monoclonal ou policlonal não é marcada;
- Quando apropriado, os reagentes para a realização da lise das células da amostra de teste.

A presente descrição também se refere a um método para a detecção e/ou identificação de DEL, de circovírus porcino excepto circovírus DEL ou de circovírus porcino outros tipo que não circovírus DEL tipo B, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de que usa uma sequência de nucleótidos como descrito.

Mais particularmente, a divulgação refere-se a um método para a detecção e/ou identificação de circovírus DEL, circovírus porcino excepto circovírus DEL ou outros tipo de circovírus porcino excepto circovírus DEL do tipo B, em uma amostra biológica, caracterizado pelo facto de compreender as seguintes etapas:

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

Estes podem ser detectados, por exemplo, pela técnica de hibridação molecular, utilizando uma sonda nucleico de acordo

com a descrição. Esta sonda vai vantajosamente caracterizada por um não-radioativo (sonda fria) ou elemento radioativo.

Para os fins desta descrição, deve ser entendida como significando "ADN da amostra biológica" ou "ADN contido na amostra biológica" ou ADN presente na amostra biológica em questão, ou, possivelmente, cADN obtido após a acção de uma enzima do tipo transcriptase reversa do ARN presente na referida amostra biológica.

Outro objectivo da presente descrição é um método tal como descrito, caracterizado pelo facto de compreender os passos seguintes:

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

A presente descrição refere-se também a um método, tal como descrito, caracterizado pelo facto de compreender os passos seguintes:

- a) contactar uma sonda de nucleótidos immobilizados sobre um substrato, tal como descrito com uma amostra orgânica, o ADN da amostra ter, eventualmente, ter sido previamente tornado acessível para hibridação, sob

condições que permitem a hibridação da sonda com o ADN da amostra;

b) contactar o híbrido formado entre a sonda de nucleótido imobilizada sobre um suporte e o ADN contido na amostra biológica, se for o caso, após a remoção do ADN da amostra biológica não possuindo hibridado com a sonda, com uma sonda de nucleótidos marcados de acordo com a descrição;

c) identificação do novo híbrido formado na etapa b).

De acordo com uma forma de realização vantajosa do método de detecção e/ou identificação anteriormente definido, este é caracterizado pelo facto de pré-lavagem no passo a), o ADN da amostra biológica é primeiro amplificado utilizando pelo menos um iniciador como descrito.

A descrição proporciona ainda um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus DEL, de circovírus porcino excepto circovírus DEL ou circovírus porcino excepto circovírus DEL de tipo B, caracterizado pelo facto de incluir os seguintes elementos:

a) uma sonda de nucleótidos como descrito;

b) opcionalmente, os reagentes necessários para a realização de uma reacção de hibridação;

c) opcionalmente, pelo menos um iniciador de acordo com a descrição e os reagentes necessários para uma reacção amplificação de ADN.

A invenção refere-se também a um kit ou conjunto para a detecção e/ou identificação de circovírus DEL, de circovírus porcino excepto circovírus DEL ou circovírus porcino excepto

circovírus DEL de tipo B, caracterizado pelo facto de compreender os seguintes elementos:

- a) uma sonda nucleotídica, chamado sonda de captura, conforme descrito;
- b) uma sonda de oligonucleotídeos, disse sonda divulgação conforme descrito;
- c) opcionalmente, pelo menos um iniciador de acordo com a descrição e os reagentes necessários para uma reacção amplificação de ADN.

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

- a) pelo menos um iniciador de acordo com a descrição;
- b) opcionalmente, os reagentes necessários para a realização de uma reacção de amplificação do ADN;
- c) se for o caso, um componente que permite a verificação da sequência de fragmentos amplificados, especificamente uma sonda oligonucleotídica de acordo com a invenção.

A descrição refere-se ainda a utilização de uma sequência de nucleótidos de acordo com a descrição, de um polipéptido de acordo com a descrição, de um anticorpo de acordo com a descrição, de uma célula de acordo com a descrição, e/ou animais transformadas, tal como descrito, para a selecção de compostos orgânicos ou inorgânicos capazes de modular, inibir ou induzir a expressão do gene, e/ou modificar a replicação

celular de circovírus DEL ou capaz de induzir ou inibir as patologias associadas à infeção por um circovírus DEL.

A descrição também inclui um método de selecção de compostos capazes de se ligar a um polipéptido ou um fragmento deste, tal como descrito, capaz de se ligar a uma sequência de nucleótidos como descrito, ou um anticorpo capaz de reconhecer, como descrito, e/ou capaz de modular, inibir ou induzir a expressão do gene, e/ou modificar a replicação celular de circovírus DEL ou capaz de induzir ou inibir estados patológicos associados com a infeção pelo circovírus DEL, caracterizado pelo facto de compreender as seguintes etapas:

- a) o contacto do referido composto com o referido polipeptídeo, em que a referida sequência de nucleótidos, com uma célula transformada tal como descrito e/ou a administração do referido composto a um animal transformada, tal como descrito;
- b) determinar a capacidade do referido composto para se ligar ao referido polipéptido ou sequência de nucleótidos, ou modular, inibir ou induzir a expressão do gene, ou de modular o crescimento ou a replicação de circovírus DEL, ou indução ou inibição na referida doenças animais transformadas relacionadas com infeção por circovírus DEL (denominada actividade do referido composto).

Os compostos capazes de serem seleccionados podem ser compostos orgânicos, tais como polipéptidos ou hidratos de carbono ou de outros compostos orgânicos ou inorgânicos já conhecidos, ou novos compostos orgânicos produzidos

utilizando técnicas de modelação molecular e obtidos por síntese química ou bioquímica, sendo essas técnicas conhecidas pelos peritos na técnica.

Os referidos compostos seleccionados podem ser utilizados para modular a replicação celular de circovírus DEL e, assim, para controlar a infeção por este vírus. Os métodos para a determinação referidas modulações são bem conhecido para os peritos na técnica.

Esta variação pode ser obtida por exemplo por um agente capaz de se ligar a uma proteína e, portanto, de inibir ou potenciar a sua actividade biológica, ou capaz de se ligar a um envelope da proteína da superfície exterior do referido vírus e a penetração do bloco do referido vírus na célula hospedeira ou de promover a acção do sistema imunitário do organismo infectado dirigida contra o referido vírus. Esta modulação pode também ser conseguida por um agente capaz de se ligar a uma sequência de nucleótidos de um vírus de ADN e o referido bloco de, por exemplo, a expressão de um polipéptido cuja actividade biológica ou estrutural é necessário para a replicação e proliferação dos referidos vírus de células hospedeiras para as células hospedeiras dos animais hospedeiros.

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

A descrição também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um composto seleccionado a partir de os seguintes compostos:

- a) uma sequência de nucleótidos de acordo com a descrição;
- b) um polipeptido de acordo com a descrição;
- c) um vector, uma partícula viral ou uma célula transformada de acordo com a descrição;
- d) um anticorpo de acordo com a descrição;
- e) um composto capaz de ser seleccionada através de um método de selecção de acordo com a descrição;

eventualmente em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável e, se for caso disso, com um ou mais adjuvantes de imunidade apropriados.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina, caracterizado pelo facto de compreender um composto seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- Um polipeptídeo isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 12, que corresponde a um ORF'2 de um circovírus DEL de tipo B,
- Um polipeptídeo isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 12, que corresponde a um ORF'2 de um circovírus DEL de tipo B,
- Uma sequência de polipeptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo um ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B,
- Uma sequência de polipeptido isolado possuindo pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B,
- Uma sequência de polipeptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e

correspondendo a ORF'2 para um tipo de circovírus B, caracterizado pelo facto de a referida sequência incluir a sequência SEQ ID N° 17,

- Uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 para um tipo de circovírus B, caracterizado pelo facto de a referida sequência incluir a sequência SEQ ID N° 18,

- Uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 para um tipo de circovírus B, caracterizado pelo facto de a referida sequência incluir a sequência SEQ ID N° 19,

- Uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 para um tipo de circovírus B, caracterizado pelo facto de a referida sequência incluir a sequência SEQ ID N° 20,

e compreendendo ainda pelo menos um adjuvante, um transportador farmacêuticamente aceitável, ou uma combinação dos mesmos.

A invenção também diz respeito a uma composição de vacina, caracterizada por compreender um composto selecionado a partir dos compostos seguintes:

a) um polipéptido seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- um polipéptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 90 % de identidade com a

sequência SEQ ID NO: 12, que corresponde a um ORF'2 de um circovírus DEL de tipo B,

- um políptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 12, que corresponde a um ORF'2 de um circovírus DEL de tipo B,

- uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B,

- uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B,

- uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 para um tipo de circovírus B, e que compreende a sequência de SEQ ID NO: 17

- uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 para um tipo de circovírus B, e que compreende a SEQ ID NO: 18

- uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo a ORF'2 para um circovírus DEL de tipo B, e que compreende a sequência de SEQ ID NO: 19

- uma sequência de polipéptido isolado possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 15 e correspondendo ORF'2 a um tipo de circovírus B, e que compreende a sequência SEQ ID N° 20, e

b) um vector para a expressão de um polipéptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo

menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 12, que corresponde a um ORF'2 de circovírus DEL do tipo B.

Pelo composto relativo ao circovírus DEL do tipo A ou B quer se dizer aqui, respectivamente, composto obtido a partir da sequência do genoma de circovírus DEL do tipo A ou B.

A descrição refere-se a uma composição imunogénica, caracterizado pelo facto de que compreende um composto selecionado a partir dos compostos seguintes:

- a) uma sequência de nucleótidos de acordo com a descrição; e
- b) uma célula de acordo com a descrição.

A descrição refere-se ainda uma composição de vacina de acordo com a invenção, caracterizado pelo facto de compreender uma mistura de dois compostos a) e b) acima, e em que um dos ditos dois compostos é no circovírus do tipo A e o outro na circovírus DEL de tipo B.

O composto nas circovírus DEL do tipo A ou B se quer dizer aqui, respectivamente composto obtido a partir da sequência do genoma de circovírus DEL do tipo A ou B.

A descrição é uma composição imunogénica e/ou vacina, caracterizado pelo facto de que compreende pelo menos um dos seguintes compostos:

- Uma sequência de nucleótidos SEQ ID N° 11, ID SEQ N° 12, ou um seu fragmento;

- Uma sequência polipeptídica de SEQ ID NO: 14, um seu fragmento ou um fragmento do polipéptido da sequência SEQ ID No. 15,
- Um vector, ou uma partícula viral que compreende uma sequência de nucleótidos SEQ ID N ° 11, ou um seu fragmento um fragmento da sequência SEQ ID n ° 12, ou
- Uma célula transformada capaz de expressar um polipeptídeo de SEQ ID NO: 14, ID SEQ N ° 15, ou um Fragmentos; ou
- Uma mistura de pelo menos dois dos referidos compostos.

A descrição também inclui uma composição imunogénica e/ou vacina de acordo com a descrição, caracterizado por a referida mistura compreende, pelo menos, dois dos referidos compostos como um produto de combinação para simultânea, separada ou escalonada no tempo, para a prevenção ou tratamento de infeção pelo circovírus DEL, especialmente do tipo B.

Numa forma de realização preferida, a composição da vacina da descrição compreende misturar os seguintes compostos:

- Um plasmídeo pcADN3 contendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID N° 11;
- um plasmídeo pcADN3 contendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID N° 12;
- Um plasmídeo pcADN3 contendo um ácido nucleico que codifica a proteína GM-CSF;
- Um vector recombinante contendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID N° 11 de baculovírus;

- Um vector recombinante contendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID N° 12 de baculovírus; e
- Sempre que necessário, um adjuvante de imunidade adequada, incluindo o adjuvante AIF™.

A invenção também se refere a uma composição farmacêutica, tal como descrito, para a prevenção ou tratamento de infecção por um circovírus DEL.

A invenção também proporciona uma composição de vacina de acordo com a invenção para a prevenção ou tratamento de infecção pelo circovírus DEL de tipo B.

A descrição também se refere a uma composição farmacêutica, tal como descrito, para a prevenção ou tratamento de infecção pelo circovírus DEL do tipo B.

A invenção também se refere à utilização de uma composição tal como descrito para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de infecção por um circovírus, de preferência pelo circovírus DEL do tipo B.

A descrição também se refere à utilização de uma composição tal como descrito para a preparação de um medicamento para a prevenção ou o tratamento de uma infecção pelo circovírus, de preferência pelo circovírus do tipo DEL B.

Noutro aspeto, a revelação refere-se a um vector, uma partícula viral ou uma célula de acordo com a descrição, para o tratamento e/ou prevenção de uma doença por terapia genética.

Finalmente, a descrição inclui o uso de um vector, uma partícula viral ou uma célula, tal como descrito para a preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença pela terapia génica.

Os polipéptidos usados na descrição das composições imunogénicas ou de vacina da invenção podem ser seleccionados por técnicas conhecidas dos especialistas na arte, tais como a capacidade de dito polipéptidos de estimular as células T, o que resulta por exemplo, em sua proliferação ou a secreção das interleucinas, e que conduz à produção de anticorpos contra os referidos polipéptidos.

Em porcos, tal como em ratinhos, nos quais uma dose de peso comparável à dose utilizada nos seres humanos administrados composição de vacina, a reacção do anticorpo foi testado através da recolha de soro, seguido por um estudo da formação de um complexo entre o anticorpo presente no soro e o antigénio da composição de vacina, de acordo com as técnicas habituais.

As composições e/ou vacina imunogénica de acordo com a invenção contém uma quantidade eficaz dos compostos da descrição, ou seja, em uma quantidade suficiente do referido composto para se obter o efeito desejado, tal como a modulação da replicação celular de circovírus. Os peritos na técnica irão determinar esta quantidade, por exemplo, dependendo da idade e do peso do indivíduo a ser tratado, o progresso da doença, os possíveis efeitos secundários e com o teste Avaliação dos efeitos obtidos com uma população de amostra, estes ensaios são conhecidos nestas áreas de aplicação.

De acordo com a invenção as referidas composições de vacina estarão de preferência em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável e, se for caso disso, com um ou mais adjuvantes apropriados da imunidade.

Hoje, vários tipos de vacinas estão disponíveis para proteger animais ou humanos contra doenças infecciosas: viver microrganismos atenuados (*M. bovis* - BCG para tuberculose), microrganismos inativados (Vírus da gripe), extractos acelulares (*Bordetella pertussis* para a tosse convulsa), proteas recombinantes (antígeno de superfície da hepatite B), polissacáridos (pneumococos). As vacinas preparadas a partir de péptidos sintéticos ou de microrganismos geneticamente modificados que expressam antigénios heterólogos estão a ser testados. Ainda mais recentemente, os ADNs plasmídicos recombinantes que transportam genes que codificam antigénios protectores foram propostos como uma estratégia de vacina alternativa. Este tipo de vacinação é realizada com um plasmídeo particular, derivada de um plasmídeo de *E. coli*, que não se replica *in vivo* e que codifica apenas a proteína vacinal. Os animais foram imunizados injectando simplesmente o ADN plasmídico no músculo. Esta técnica conduz a expressão da proteína da vacina *in situ* e a uma resposta imune tipo celular (CTL) e humoral (anticorpos). Esta dupla indução da resposta imunitária é uma das principais vantagens da técnica de vacinação com ADN nu.

As composições de vacinas que compreendem as sequências de nucleótidos ou os vectores em que o referido sequências são inseridas, são, em especial, descrita no pedido de patente internacional No. WO 90/11092 e também no pedido de patente internacional No. WO 95/11307.

A sequência de nucleótidos que constituem a composição de vacina, conforme descrito pode ser alimentado para o hospedeiro, depois de ter sido acoplado a compostos que promovem a penetração deste polinucleótido dentro da célula ou o seu transporte para o núcleo da célula. Os conjugados resultantes podem ser encapsulados em micropartículas poliméricas, como descrito no pedido de patente internacional No. WO 94/27238 (Medisorb Technologies International).

De acordo com uma outra forma de realização da composição de vacina da invenção, a sequência de nucleótidos, preferencialmente um ADN, é complexada com DEAE-dextrano (Pagano et al., 1967) ou com proteínas nucleares (Kaneda et al. 1989), com lípidos (Felgner et al. 1987) ou encapsulada em lipossomas (Fraley et al. 1980) ou introduzido na forma de um gel que facilita a sua transfecção dentro das células (Midoux et al., 1993, Pastore et al, 1994). O polinucleótido ou vector da invenção pode também ser suspenso numa solução tampão ou estar associado com lipossomas.

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

Uma tal vacina de acordo com a invenção também pode ser preparada na forma de uma composição contendo um vector tal como descrito, sob o controlo de elementos reguladores que permitem a sua expressão em humanos ou animais. Ele pode por exemplo ser usado como vector in vivo do antigénio polipéptido de interesse expressão, o plasmídeo pcADN3 ou o

pcDNA1/neo plasmídeo, ambos comercializados pela Invitrogen (R & D Systems, Abingdon, Reino Unido). Também se pode utilizar o plasmídeo V1Jns.tPA, descrito por Shiver et al. 1995. Tal vacina de acordo a invenção compreenderá vantajosamente além de o vector recombinante, uma solução salina, por exemplo uma solução de cloreto de sódio.

O significado de suporte farmacêuticamente aceitável, um composto ou combinação de compostos que entram numa composição farmacêutica ou vacina não provoca reações secundárias e permite, por exemplo, facilitar a administração do composto ativo, o aumento a sua vida e/ou a eficácia dos mesmos no corpo, aumentando a sua solubilidade em solução, ou para melhorar a sua armazenagem. Estes transportadores farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos e pode ser adaptado por um perito na arte, dependendo da natureza e do modo de administração do composto ativo escolhido.

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

Estes compostos podem ser administrados por via sistémica, em particular por via intravenosa, intramuscular, intradérmica ou subcutânea, ou por via oral. Mais preferencialmente, a composição de vacina que compreende polipéptidos de acordo com a invenção será administrada por via intramuscular,

através de dieta ou por nebulização repetidamente, espaçadas ao longo do tempo.

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

A presente invenção refere-se também à utilização de sequências de nucleótidos de circovírus DEL de acordo com a invenção, para a construção de vectores retrovirais autoréplicativos e aplicações terapêuticas *cellesci*, em particular no campo da terapia genética humana *in vivo*.

A viabilidade da terapia genética em humanos está bem estabelecida e trata-se de muitas aplicações terapêuticas, tais como as doenças genéticas, doenças infecciosas e cânceros. Muitos documentos da técnica anterior descrevem como implementar uma terapia genética, em particular por meio de vectores virais. Em geral, os vectores são obtidos por deleção de pelo menos uma parte dos genes virais, que são substituídos pelos genes de interesse terapêutico. Tais vectores podem ser propagados numa linha celular de complementação, que fornece *in trans* as funções virais deletadas para gerar uma partícula de vector viral para a replicação defeituosa, mas que pode infectar uma célula hospedeira. Até à data, os vectores retrovirais são os mais utilizados e no modo de infecção é amplamente descrito na literatura disponível para os peritos na técnica.

O princípio da terapia génica é a entrega de um gene funcional, o referido gene de interesse, a ARN ou a proteína correspondente produzir o efeito bioquímico desejado em células ou tecido alvo. Por um lado, a inserção de genes que permite que as moléculas complexas e instáveis prolongados, tais como ARN ou proteínas que podem ser extremamente difíceis ou impossíveis de obter ou administrar directamente a expressão. Além disso, a inserção controlada do gene desejado no interior das células-alvo específicas podem regular o produto de expressão nos tecidos. Para isso, é necessário ser capaz de inserir as células desejadas dentro do gene terapêutico seleccionado e, por conseguinte, que o método de inserção capazes de visar especificamente as células ou tecidos seleccionados.

Entre os métodos de inserção de genes, como por exemplo a micro-injecção, incluindo injecção de plasmídeo de ADN nu (Derse, D. et al. De 1995, e Zhao, TM et al. 1,996), electroporação, a recombinação homóloga, a utilização de partículas virais, tais como o retrovírus, é difundido. No entanto, quando aplicado, in vivo, os sistemas de transferência de genes tais exibem retroviral recombinante, tanto baixa infectividade (insuficiente concentração de partículas virais) e uma falta de especificidade em relação a células alvo seleccionadas.

A forma de realização de vectores virais específicos das células que têm um tropismo específico de tecido e a transdução com o gene de interesse pode ser convenientemente levada a cabo por células alvo, por exemplo, ser conseguida através da fusão de um ligando específico de células hospedeiras porção alvo N-terminal de uma proteína de

superfície do envelope do circovírus. Estes incluem por exemplo a construção de partículas retrovirais contendo a molécula de CD4 na superfície da caixa, de modo a atingir as células humanas infectadas com o vírus VIH (Young et al JAT. Science 1990, 250, 1421-1423), as partículas virais que tenham uma hormona peptídica com uma proteína de fusão de envelope para infectar especificamente células que expressam o receptor correspondente (Kasahara, N. et al. Ciência 1994, 266, 1373-1376) ou, alternativamente, com as partículas virais um fundido capaz de se ligar ao receptor do factor de crescimento epidérmico (EGF) (Cosset, FL et al. J. of Virology 1995, 69, 10, 6314-6322) polipeptídeo. Em outra abordagem, os fragmentos individuais de anticorpos contra os antigénios de superfície de cadeia As células alvo são introduzidos através de fusão com a porção N-terminal da proteína de revestimento (VALSESIA-WITTMAN, S. et al, J. of Virology 1996, 70, 3, 2059-2064;. TEARINA CHU, e TH al. J. of Virology 1997, 71, 1, 720-725).

Para os fins desta descrição, um gene de interesse em uso na descrição pode ser obtido a partir de um organismo ou vírus eucariótica ou procariótica por qualquer técnica convencional. Ele é de preferência capaz de produzir um produto de expressão tendo um efeito terapêutico e pode ser um produto homólogo para a célula hospedeira, ou, alternativamente, heteróloga. No contexto da presente descrição, um gene de interesse pode codificar um produto de (i) intracelular, (ii) presente na superfície da membrana da célula hospedeira ou (iii) segregado a partir da célula hospedeira. Ele pode, pois, compreender elementos adicionais, tais como, por exemplo, uma sequência que codifica um sinal

de secreção. Estes sinais são conhecidos dos peritos na técnica.

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

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

- Uma citocina incluindo interleucina, interferão, factor de necrose do tecido e um factor de crescimento incluindo hematopoiética (G-CSF, GM-CSF),
- Um factor ou cofactor envolvida na coagulação e incluindo o Factor VIII, o factor von Willebrand, a antitrombina III, proteína C, trombina e hirudina,

- Uma enzima ou um inibidor de enzima, tais como inibidores da protease viral,
- Um produto de um gene suicida tal como o HSV timidina cinase (vírus do herpes) expressão do tipo 1, - Um activador ou inibidor de canais iônicos,
- Uma proteína cuja ausência, modificação ou desregulação da expressão é responsável por uma doença do gene, tais como a proteína CFTR, distrofina ou minidistrofina, insulina, ADA (adenosina diaminase) glucocerebrosidase e fenilhidroxilase,
- A proteína capaz de inibir a iniciação ou progressão do cancro, tais como produtos de genes de expressão supressor de tumor, como o p53 e os genes Rb,
- Uma proteína capaz de estimular uma resposta imunitária ou um anticorpo, e
- Uma proteína capaz de inibir uma infeção virai, ou o seu desenvolvimento, tal como epítomos antigénicos do vírus ou variantes alteradas de proteínas virais capazes de competir com as proteínas virais nativas relevantes.

A descrição diz respeito, portanto, os vectores caracterizados pelo facto de compreender uma sequência de nucleótidos como circovírus descrito, e em que eles compreendem ainda um gene de interesse.

A presente descrição também se refere a partículas virais geradas a partir do referido vector de descrição. Refere-se ainda a métodos para a produção de partículas virais de acordo com a descrição, caracterizadas pelo facto de empregar um vector tal como descrito, incluindo as partículas virais semelhantes (VLP, Vírus-Like Particles).

A descrição também se refere a transfectada com um vector tal como descrito para as células de animais.

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

A presente invenção é também dirigida a uma composição de vacina compreendendo um vector como reivindicado na reivindicação 10, agente terapêutico ou profilático, em combinação com um veículo aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

A presente descrição refere-se também a um vector, uma partícula viral ou uma célula de acordo com a descrição, para o tratamento e/ou prevenção de uma desordem genética ou de uma doença adquirida, tais como cancro ou uma doença infecciosa. A descrição também se trata de uma composição farmacêutica compreendendo, como um vector ou uma célula de acordo com a invenção, para o agente terapêutico ou profilático, em combinação com aspetos de veículos farmacêuticamente aceitáveis.

Outras características e vantagens da invenção aparecem nos exemplos e nas figuras seguintes:

Legendas das figuras

Figura 1: Esquema experimental que permitiu conseguir-se o isolamento e a identificação do circovírus associado ao DEL do tipo A e B.

Teste 1: reprodução experimental do DEL por inoculação de órgãos triturados de porcos de criações atingidas por DEL.

Teste 2: reprodução experimental do DEL.

Teste 3: reprodução experimental do DEL.

Teste 4: ausência de reprodução experimental do DEL.

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

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

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

Figura 4: Alinhamento da sequência de aminoácidos SEQ ID N° 6 do polipéptido codificado pela sequência nucleotídica SEQ ID N°3 (ORF1) do circovírus DEL do tipo A (PCVA) e das sequências nucleotídicas correspondentes dos circovírus estirpe MEEHAN e estirpe MANKERTZ das linhas celulares porcinas.

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

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

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

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

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

Figura 9: Evolução do ganho médio quotidiano (GQM) de porcos de criação atingidos pela doença do emagrecimento do leitão (DEL ou DFL), colocados nas condições experimentais.

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

Figura 11: Hipertermia superior a 41°C, expressa em percentagem comparada para os 3 lotes de porcos (F1, F3 e F4)

calculada por semana ao longo de um período de 28 dias, após teste de vacinação.

Figura 12: Membranas dos “spots” de péptidos correspondentes aos ORF2 revelados com auxílio de um soro de porco infectado, proveniente de uma criação convencional.

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

Os péptidos imunogénicos não específicos são indicados em itálico. Figura 13: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pela ORF2 do circovírus DEL de tipo A e pela ORF2 do circovírus DEL do tipo B. A posição de 4 péptidos correspondente a epitopos específicos do circovírus DEL do tipo B é indicada na sequência correspondente com um traço grosso, o homólogo na sequência do circovírus DEL do tipo é igualmente indicado com um traço simples.

EXEMPLOS

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

1- Procedimentos experimentais

Reprodução experimental da infeção e da sua síndrome (cf. Figura 1).

Foi realizado um primeiro teste com porcos provenientes de uma criação de muito bom porte mas atingida pela doença do

emagrecimento do leitão (DEL) ou denominada igualmente DFL (Definhamento Fatal do Leitão). Testes de contacto com porcos IOPE (Isentos de organismos patogénicos especificados) mostraram uma transferência de contaminante(s) traduzindo-se por uma patologia complexa associando a hipertermia, o desacelerar do crescimento, diarreia e conjuntivite. O vírus SRRS (síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, doença infecciosa devida a um arterivírus) foi rapidamente isolado a partir dos porcos da criação e dos porcos contacto. O conjunto dos sinais clínicos poderia ter sido atribuído à presença do vírus SRRS. No entanto, dois porcos de criação apresentaram sinais de DFL sem que o vírus SRRS tenha sido isolado. As análises histológicas e fórmulas sanguíneas mostraram no entanto que estes porcos estavam atingidos de um processo infeccioso de origem viral.

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

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

Conclusão

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

2- Estudos em laboratório

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

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

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

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

Conclusão

Pelo menos dois tipos de vírus foram evidenciados na matéria triturada de órgãos de porcos doentes de DFL. Um é o adenovírus, mas não produz por si só a doença. O outro tipo de vírus é um circovírus e está associado ao DFL. Este circovírus, do qual foram isolados e sequenciados dois tipos, aqui de seguida denominados circovírus DEL de tipo A (ou PCVA) e circovírus DEL do tipo B (ou PCVB) apresentam mutações em relação às sequências conhecidas de circovírus não patogénicos para o porco.

3- Clonagem e sequenciação do ADN do circovírus DEL do tipo A

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

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

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

4- Comparação das sequências nucleotídicas e de aminoácidos do circovírus DEL do tipo A (ou associado à DEL) Óbidos com as sequências correspondentes de circovírus MEEHAN e MANKERTZ de linhas celulares porcinas

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

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

1. detecção específica do circovírus DEL do tipo A:

iniciador PCV 5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';

iniciador PCV 10: 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';

2. detecção específica do circovírus das linhas celulares:

iniciador PCV 5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';

iniciador MEE1: 5' TGG AAT GTT AAC TAC ATC AA 3';

3. detecção diferencial:

Os pares de iniciadores utilizados são aqueles por exemplo descritos nos parágrafos 1 e 2 acima;

4. detecção das formas replicativas RF (replicative forms) circulares monoméricas:

iniciador PCV 5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';

iniciador PCV 6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';

5. detecção dos vectores contendo dímeros em série:

dímero Nar:

iniciador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';

iniciador PCV 5: 5'GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3'; dímero Kpn:
iniciador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';
iniciador PCV 6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';

6. detecção diferencial:

os pares de iniciadores são aqueles por exemplo descritos nos parágrafos 4 e 5 acima.

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

As construções em série do genoma viral (dímeros) tais como as construções utilizadas para a preparação do vector pBS KS+ Tandem PCV Kpn 1, depositado na CNCM com o número I-1891, a 3 de Julho de 1997 (*E. coli* transformada pelo referido vector) são muito interessantes para a sua utilização nos métodos de produção em quantidade suficiente de um inóculo constituído por ADN, destinado à produção de vírus e isto na ausência de protocolo satisfatório de produção de vírus em sistema celular. Os referidos métodos de produção utilizam estas construções em série do genoma viral permitirão estudar por mutação os factores de virulência e por consequência poderão ser utilizados para o fabrico de uma colecção de vírus com as mutações indicadas na construção dos vectores que apresentarão o tropismo e a virulência apropriados. Estes vectores de estrutura auto-replicativa apresentam propriedades procuradas em transferência de genes,

especialmente para as suas aplicações em terapia génica, e em vacinologia.

Análise por “Western-Blot” das proteínas recombinantes do circovírus DEL do tipo A

Os resultados foram obtidos utilizando um antisoro específico do circovírus DEL produzido aquando do ensaio 1 (cf. figura 1).

Tipo de produtos analisados

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

A cultura das células Sf9 foi realizada numa caixa de Petri de 25 cm² segundo os métodos de cultura convencionais para estas células. Após centrifugação, os sedimentos celulares são retomados por 300 µL de tampão PBS (tampão fosfato salino).

Electroforese (SDS-PAGE)

A electroforese é realizada dos extractos celulares de células Sf9 obtidos anteriormente em 5 amostras (cf. tabela 1 abaixo) nas seguintes condições:

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

Tabela 1: Natureza das amostras submetidas à electroforese

N° poços	1	2	3	4	5
Depósitos	PM Rainbow	Raoul 24 h	Raoul 48 h	Raoul 72 h	Raoul 96 h
µL amostra	10	15	15	15	15
µL Laemli 4X	0	5	5	5	5

Legendas da tabela 1:

Laemli 4X: tampão de carga

PM Rainbow: marcadores de peso molecular (35, 52, 77, 107, 160 e 250 kDa) Raoul 24 h, 48 h, 72 h e 96 h: produtos de expressão do ORF1 do circovírus DEL do tipo A.

“Western-blot”

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

O Western-blot é realizado nas seguintes condições:

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

2) 1° anticorpo:

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

3) 2° anticorpo:

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

4) Revelação

Utiliza-se para a revelação substrato 4-cloro-1-nafotol, na presença de água oxigenada.

Resultados

Os resultados são representados na figura 7.

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

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

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

Os resultados obtidos são representados pela tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Cinética de aparecimento dos anticorpos específicos

Amostra	Porco	10/06	16/06	23/06	01/07	08/07	15/07	21/07
A3	1						Neg.	

Controlo	2						Neg.	
B2	1	Neg.	Neg.	Neg.	+	+	++	+++
Infec.	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
RP+	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+	+
	4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	++

Legendas da tabela 2:

A3 Controlo: animais controlo não infectados;

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

Neg.: negativo;

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

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

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

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

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

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

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

Os resultados expressos em % de homologia são representados nas tabelas 3 e 4 seguintes.

Tabela 3: Análise comparada das seqüências de aminoácidos

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

Tabela 4: Análise comparada das seqüências de nucleotídicas

% homologia	Genômica	ORF1	ORF2	O resto
PCVA/PCVB	70,4	80,4	60,1	66,1

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

a) Ensaio N° 1: Observação da doença

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

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

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

Tabela 5: recapitulação das medições efectuadas aquando das reproduções experimentais da DEL (entre parêntesis são apresentados os valores dos animais controlo, os valores sublinhados indicam uma diferença entre animais infectados e animais controlo)

Ensaio Medição	2	3	4	5	6	7
Estatuto dos porcos	IOPE CNEVA	IOPE terreno	IOPE CNEVA	IOPE CNEVA	Convencionais	Convencionais
Idade	9 semanas	6 semanas	5 semanas	5 semanas	5 semanas	6-7 semanas
Número	4	6	12	8	8	8
Via de inoculação	Via intratraqueal	Via intratraqueal	Via intratraqueal	Via intratraqueal	Via intratraqueal	Via intratraqueal
Título inoculo por porco	ND*	ND*	intramuscular 10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	intramuscular 10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	intramuscular 10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	intramuscular 10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT
Início das hipertermias	10 dias pós- infeção	9-13 dias pós- infeção	12-13 dias pós-infeção	9-14 dias pós- infeção	8-12 dias pós- infeção	12 dias pós- infeção
% de porcos em hipertermia **	100%	83%	92%	100%	75%	88%
No de dias de hipertermia por porco **	7	4,5	3,3	5,8	7,5	11,6
Temperaturas	40,4 a 41,7°C	40,6 a 42,3°C	40,2 a 41,6°C	40,3 a 40,8°C	40,6 a 42°C	40,2 a 41,9°C

máximas ***							
Hipertermia **** % por semana							
S1	3,5 (3,5)	17 (36)	7 (5)	37 (17)	16 (17)	20 (28)	
S2	42 (3,5)	7 (13)	<u>13 (1)</u>	<u>21 (3)</u>	<u>52 (10)</u>	37 (28)	
S3	<u>35 (3,5)</u>	<u>33 (10)</u>	28 (7)	<u>62 (2)</u>	<u>34 (12)</u>	<u>79 (17)</u>	
S4	<u>21 (3,5)</u>	<u>28 (7)</u>	5 (0)	6 (3)	25 (22)	<u>55 (3)</u>	

(continuação)

Ensaio	2	3	4	5	6	7
Medição						
GMQ:						
S1	928 (1053)	417 (357)	564 (620)	650 (589)	401 (407)	509 (512)
S2	<u>678 (1028)</u>	<u>428 (617)</u>	<u>503 (718)</u>	612 (584)	<u>294 (514)</u>	410 (310)
S3	<u>661 (1000)</u>	771 (642)	<u>381 (657)</u>	<u>520 (851)</u>	<u>375 (586)</u>	435 (440)
S4	<u>786 (1100)</u>	<u>550 (657)</u>	764 (778)	641 (696)	<u>473 (610)</u>	<u>451 (681)</u>
Transmissão porcos contactos	Sim a 100 %	Sim a 75%	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado

%lesões pulmonares	25	75	0	25	25	12
% lesões ganglionares	17	33	67	25	50	12

* ND: não determinado,
** hipertermia quando a temperatura é superior a 40°C,
*** leque das temperaturas máximas recolhidas a nível individual
**** a percentagem corresponde ao número de recolhas de temperatura superior a 40°C dividida pelo número total de recolhas de temperatura na semana no conjunto dos porcos.

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

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

A multiplicação dos ensaios experimentais em porcos teve como objectivo dominar e melhor caracterizar o modelo experimental. O conjunto dos resultados é apresentado na tabela 5.

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

Conclusão

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

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

1) Animais utilizados para o estudo

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

2) Composição de vacina testada e protocolo de vacinação

a) Compostos utilizados para o estudo

Os plasmídeos foram obtidos a partir do plasmídeo pcADN3 de INVITROGENE

- Plasmídeos pcADN3 ORF-

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

- Plasmídeo pcADN3ORF1+ e plasmídeo pcADN3ORF2+

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

- Plasmídeo GMCSF+

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

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

O gene que codifica para esta proteína GM-CSF foi clonado e sequenciado por Inumaru et al. (Immunol. Cell Biol., 1995, 73 (5), 474-476). O plasmídeo pcADN3-G;CSF+ foi obtido junto do Dr. B. Charley do INRA de Jouy-en-Josas (78, França).

- Baculovírus recombinantes

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

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

- Adjuvante

O adjuvante fornecido pela Sociedade Seppic, filiar de AIR LIQUIDE é o adjuvante correspondente à referência AIF SEPPIC.

b) Protocolo de vacinação

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

Os lotes A, B e C, com 3 semanas de idade, recebem cada um uma primeira injeção (injeção M1) de 1 mL contendo 200 microgramas de plasmídeos (ADN nu) em PBS, pH: 7,2, por via intramuscular para cada um dos plasmídeos mencionados de seguida para cada lote, e depois, à idade de 5 semanas uma segunda injeção (injeção M2) contendo estes mesmos plasmídeos. Uma terceira injeção é praticada simultaneamente do outro lado do pescoço. Esta terceira injeção compreende 1 mL de uma solução contém $5 \cdot 10^6$ células infectadas por baculovírus recombinantes e 1 mL de adjuvante AIF SEPPIC.

Lote A (F1) (Lote controlo):

- primeira injeção

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

- segunda e terceira injeções (simultâneas)

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

Lote B (F2) (lote controlo):

- primeira injeção

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

- segunda e terceira injeções (simultâneas)

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

Lote C (F3):

- primeira injeção

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

- segunda e terceira injeções (simultâneas)

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

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

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

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

3) Monitorização dos lotes

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

- consistências das matérias fecais: todos os dias;

- registos habituais: amostragem de sangue semanal, pesagens;

- pesagens da alimentação recusada: 3 vezes por semana;

- cálculo do ganho médio quotidiano em peso (gmq).

Os ganhos médios quotidianos foram calculados para cada um dos lotes ao longo de um período de 28 dias após o teste (cf. figura 10), um cálculo intermediário do gmq foi igualmente efectuado para cada um dos lotes no primeiro e no segundo período de 14 dias. Os resultados obtidos são aqui apresentados de seguida na tabela 6.

Tabela 6: Ganhos médios quotidianos

	F1	F2	F3	F4
j0-j14	411 g	450 g	511 g	461 g
j14-j28	623 g	362 g	601 g	443 g
j0-j28	554 g	406 g	556 g	452 g

- Medição da hipertermia

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

Tabela 7: Hipertermias > 41°C

	F1	F2	F3	F4
S1	4,1	0,	0,	0,
S2	10,7	16,	0,	8,9
S3	4,7	27,	0,	45,
S4	0,	0,	0,	7,5

Tabela 8: Hipertermias > 40,2°C

	F1	F2	F3	F4
S1	29,1	10,41	29,1	20,8
S2	28,5	39,2	10,7	37,5
S3	14,3	68,7	25,0	81,2
S4	3,3	17,5	20,0	55

4) Conclusão

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

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

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

um circovírus DEL de uma composição vacinal de acordo com a invenção.

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

A- Diagnóstico Serológico por proteínas recombinantes

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

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

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

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

fundo de 3 cúpulas diferentes de uma microplaca Nunc Maxisorp por incubação uma noite a +4°C.

A reactividade de soros de porcos em relação a cada uma destas fracções antigénicas é avaliada através de uma reacção ELISA indirecta cujo protocolo experimental é detalhado abaixo:

- Etapa de saturação: 200 µL/cúpula de PBS1X/Leite semi-desnatado 3%, incubação 1 h 30 a 37°C.
- Lavagem: 200 µL/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05 %, 3 lavagens rápidas.
- Etapa de incubação dos soros: 100 µL/cúpula de soro diluído a 1/100 em PBS1X/Leite semi-desnatado, 1%/Tween 20: 0,05 %, incubação 1 h a 37°C.
- Lavagem: 200 µL/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05 %, 2 lavagens rápidas seguidas de 2 lavagens de 5 min.
- Etapa de incubação do conjugado: 50 µL/cúpula de conjugado coelho anti-porco diluído a 1/1000 em PBS1X/Leite semi-desnatado, 1%/Tween 20: 0,05 %, incubação 1 h a 37°C.
- Lavagem: 200 µL/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05 %, 2 lavagens rápidas seguidas de 2 lavagens de 5 min.
- Etapa de revelação: 100 µL/cúpula de substrato OPD/Tampão Citrato/H₂O₂, incubação 15 min a 37°C.
- Paragem da Reacção: 50 µL/cúpula H₂SO₄ 1N.
- Leitura no espectrofotómetro a 490 nm.

Resultados

Os resultados obtidos são apresentados aqui abaixo na tabela 9.

Tabela 9:

Antigénios	Reactividade Soro	Reactividade Soro
------------	-------------------	-------------------

	de Porco não inoculado pelo Circovírus	de Porco inoculado pelo Circovírus
Sf9 controlo purificado	0,076	0,080
Sf9 que expressa ORF'2 purificado	0,071	1,035

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

B - Diagnóstico Serológico por Péptido de Síntese

A cartografia epitópica das proteínas codificadas por exemplo pelas sequências ORF1 e ORF2 dos dois tipos de circovírus DEL (tipos A e B) permitiu entre outros identificar os epitopos circovirais imunogénicos nas proteínas codificadas pelas sequências nucleicas ORF'1 e ORF'2 assim como os epitopos específicos da proteína codificada pela sequência nucleica ORF'2 do circovírus DEL tipo B. Quatro epitopos específicos do circovírus DEL tipo B e um epitopo comum aos dois tipos de circovírus DEL situados nas proteína codificada pela sequência nucleica ORF'2 foram sintetizados sob a forma de péptido. Os péptidos equivalente no circovírus de tipo A foram igualmente sintetizados. Todos estes péptidos foram avaliados como antigénios de diagnóstico no quadro da realização de um teste serológico.

Resultados

Os resultados obtidos são representados na tabela 10 seguinte.

Tabela 10: Resultados da avaliação como antígeno de diagnóstico de peptídeos sintéticos codificados por sequências nucleicas ORF2 e ORF'2 de circovírus DEL do tipo A e B.

Reatividade Soro Porco Infectado									
Peptídeo DEL	Tipo Circovírus	Posição	Sequência AA	IOPE D0/D54	Convencional 1		Convencional 2		Especificidade Epitópica
					D0/D42	D0/D42	D0/D42	D0/D42	
121	B	71-85	VMMRFNINDFLPPG	+/-, +++	+/-, +++	-	+++	-	Circovírus B
177	A	70-84	NVNELRFMGQFLPP	+/-, +	+/-, +/-	+/-, -			
132	B	115-129	QDRGVSSAVILDD	+/-, +/-	++, ++	+/-, +			Circovírus B
188	A	114-127	TSNQRGVGSTVIL	+/-, -	-, +/-	+/-, +/-			
133	B	119-134	GVSSAVILDDNVFTK	-	++, +++	+/-, ++			
189	A	118-132	RGVSTVILDANFV	+/-, -	-	+/-, +/-			
146	B	171-185	FTIDYFQPNRRNQL	-	+/-	-	++		Circovírus A & B
152	B	195-209	VDHVGLGTAFENSIY	-	+++	+/-, +			Circovírus B
208	A	194-208	NVEHTGLGYALQNAI	-	-	-			

+/-, +, ++, +++. Intensidades crescentes das reatividades observadas em peptídeos-"Spot" em membrana de nitrocelulose. Os soros porcinos testados são provenientes de animais experimentalmente infectados pelo circovírus do tipo B no seio dos biotérios do CNEVA. Os animais são amostrados antes da inoculação a J0 e 42 dias ou 54 dias após a inoculação J42, J54.

EXEMPLO 7: Caracterização dos epítopos específicos do circovírus DEL do tipo B

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

Tabela 11: Sequência de aminoácidos dos 56 péptidos de 15 aminoácidos sintetizados a partir da sequência nucleica ORF'2 (tipo B) e ORF2 (tipo A) de circovírus DEL com o respetivo número de "spot" correspondente (cf. figura 12)

ORF'2 tipo B		ORF2 tipo A	
"Spot" n°	Sequência	"Spot" n°	Sequência
104	MTYPRRRYRRRRHRP	160	MTWPRRRYRRRRTRP
105	RRRYRRRRHRPRSHL	161	RRRYRRRRTRPRSHL
106	RRRRHRPRSHLGQIL	162	RRRTRPRSHLGNIL
107	HRPRSHLGQILRRRP	163	TRPRSHLGNILRRRP
108	SHLGQILRRRPWL VH	164	SHLGNILRRRPYL VH
109	QILRRRPWL VHPRHR	165	NILRRRPYL VHPAFR
110	RRPWL VHPRHRYRWR	166	RRPYL VHPAFRNRYR
111	LVHPRHRYRWRKNG	167	LVHPAFRNRYRWRK
112	RHRYRWRKNGIFNT	168	AFRNRYRWRKGTGIF
113	RWRKNGIFNTRLSR	169	RYRWRKGTGIFNSRL
114	KNGIFNTRLSRTFGY	170	RRKTGIFNSRLSREF
115	FNTRLSRTFGYTVKR	171	GIFNSRLSREFVLT I
116	LSRTFGYTVKR TTVR	172	SRLSREFVLTIRGGH
117	FGYTVKR TTVRTPSW	173	REFVLTIRGGHSQPS
118	VKR TTVRTPSWAVDM	174	LTIRGGHSQPSWNVN
119	TVRTPSWAVDMMRFN	175	GGHSQPSWNVNELRF
120	PSWAVDMMRFNINDF	176	QPSWNVNELRFNIGQ
121	VDMMRFNINDFLPPG	177	NVNELRFNIGQFLPP
122	RFNINDFLPPGGGSN	178	LRFNIGQFLPPSGGT
123	NDFLPPGGGSNPRSV	179	IGQFLPPSGGTNPLP

124	PPGGGSNPRSVPFEEY	180	LPPSGGTNPLPLPFQ
125	GSNPRSVPFEEYRIR	181	GGTNPLPLPFQYYRI
126	RSVPFEEYRIRKVKV	182	PLPLPFQYYRIRKAK
127	FEYRIRKVKVEFWP	183	PFQYYRIRKAKYEFY
128	RIRKVKVEFWPCSPI	184	YRIRKAKYEFYPRDP
129	VKVEFWPCSPITQGD	185	KAKYEFYPRDPITSN
130	FWPCSPITQGDRGVG	186	EFYPRDPITSNQRGV
131	SPITQGDRGVGSSAV	187	RDPITSNQRGVGSTV
132	QGDRGVGSSAVILDD	188	TSNQRGVGSTVVILD
133	GVGSSAVILDDNFVT	189	RGVGVSTVVILDANFV
134	SAVILDDNFVTKATA	190	STVVILDANFVTPST

(continuação)

ORF' 2 tipo B		ORF2 tipo A	
"Spot" n°	Sequência	"Spot" n°	Sequência
135	LDDNFVTKATALTYD	191	ILDANFVTPSTNLAY
136	FVTKATALTYDPYVN	192	NFVTPSTNLAYDPYI
137	ATALTYDPYVNYSSR	193	PSTNLAYDPYINYSS
138	TYDPYVNYSSRHTIT	194	LAYDPYINYSSRHTI
139	YVNYSSRHTITQPFS	195	PYINYSSRHTIRQPF
140	SSRHTITQPFSYHSR	196	YSSRHTIRQPFTYHS
141	TITQPFSYHSRYFTP	197	HTIRQPFTYHSRYFT
142	PFSYHSRYFTP KPVL	198	QPFTYHSRYFTP KPE
143	HSRYFTP KPVLDFTI	199	YHSRYFTP KPELDQT
144	FTP KPVLDFTIDYFQ	200	YFTP KPELDQTI DWF
145	PVLDFTIDYFQPNNK	201	KPELDQTI DWFQPNN
146	FTIDYFQPNNKRNL	202	DQTI DWFQPNNKRNL
147	YFQPNNKRNLWLRL	203	DWFQPNNKRNLWLHL
148	NNKRNLWLRLQTAG	204	PNNKRNLWLHLNTH
149	NQLWLRLQTAGNVDH	205	RNQLWLHLNTHTNVE
150	LRLQTAGNVDHVGLG	206	WLHLNTHTNVEHTGL
151	TAGNVDHVGLGTAFE	207	NHTNVEHTGLGYAL
152	VDHVGLGTAFENSIY	208	NVEHTGLGYALQNAT
153	GLGTAFENSIYDQEY	209	TGLGYALQNATTAQN
154	AFENSIYDQEYNIRV	210	YALQNATTAQNYVVR
155	SIYDQEYNIRVTMYV	211	NATTAQNYVVRLLTIY

156	QEYNIRVTMYVQFRE	212	AQNYVVRLTIYVQFR
157	IRVTMYVQFREFNFK	213	VVRLTIYVQFREFIL
158	MYVQFREFNFKDPPL	214	TIYVQFREFILKDPL
159	VQFREFNFKDPPLNP	215	YVQFREFILKDPLNE

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

A referência dos "spots" e das sequências peptídicas correspondentes é dada na tabela 11.

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

Uma comparação entre as sequências peptídicas dos circovírus do tipo A e B (figura 13) indica uma divergência que vai de

20 a 60 % para os péptidos imunorreactivos específicos do tipo B, e uma divergência mais fraca (13 %) entre os péptidos não específicos.

Referências bibliográficas

- Allan, G. M. et al., 1995, *Vet. Microbiol.*, 44: 49-64.
- Barany, F., 1911, *PNAS. USA*, 88: 189-193.
- Boulton, L.H. et al., 1997, *J. Gen. Virol.*, 78 (Pt 6), 1265-1270.
- Buckholz, R.G., 1993, *Yeast systems for the expression of heterologous gene products. Curr. Op. Biotechnology*, 4: 538-542.
- Burg, J.L. et al., 1996, *Mol. and Cell. Probes*, 10: 257-271.
- Chu, B.C.F. et al., 1986, *NAR*, 14: 5591-5603.
- Chu, P. W.G. et al., 1993, *Virus Research*, 27: 161-171.
- Clark, E.G., 1997, *American Association of Swine Practitioners*, 499-501.
- Daft, B. et al., 1996, *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 32.
- Derse, D. et al., 1995, *J. Virol.*, 69(3): 1907-1912.
- Duck, P. et al., 1990, *Biotécnicas*, 9: 142-147.
- Dulac, G.C. et al., 1989, *Can. J. Vet. Res.*, 53: 431-433.
- Edwards, C.P., E Aruffo, A., 1993, *Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology*, 4: 558-563.
- Edwards, S. et al., 1994, *Vet. Rec.*, 134: 680-681.
- Erlich, H.A., 1989, *Em PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification*. Nova Iorque: Stockton Press.
- Felgner, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 7413.
- Fontes, E.P.B. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, Nº 11: 8459-8465.
- Fraley et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255: 10431.

Guateli, J.C. et al., 1990, PNAS. USA, 87: 1874-1878.

Hackland, A.F. et al., 1994, Arch. Virol., 139: 1-22.

Hanson, S.F. et al., 1995, Virology, 211: 1-9.

Harding, J.C., 1997, American Association of Swine Practitioners, 503.

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

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

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

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

Houbenweyl, 1974, in Methode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volume 15-I e 15-II, Thieme, Estugarda.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Murphy, F.A. et al., 1995, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Viena Nova Iorque.

Nayar, G.P. et al., 1997, Can. Vet. J. 38(6): 385-386.

Olins, P.O., e Lee, S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology, 4: 520-525.

Pagano et al., 1967, J. Virol., 1: 891.

Rolfs, A. et al., 1991, Em PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease. Berlim: Springer-Verlag.

Sambrook, J. et al., 1989, In Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-Pescador, R., 1988, J. Clin. Microbiol., 26(10): 1934-1938.

Segev D., 1992, em «Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules». Kessler C. Springer Verlag, Berlim, Nova Iorque: 197-205.

Shiver, J.W., 1995, em Vaccines 1995, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E., pp.95-98, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque.

Tascon, R.E. et al., 1996, Nature Medicine, 2(8): 888-892.

Tischer, I. et al., 1982, Nature, 295: 64-66.

Tischer, I. et al., 1986, Arch. Virol., 91: 271-276.

Tischer, I. et al., 1988, Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 270: 280-287.

Tischer, I. et al., 1995, Arch. Virol., 140: 737-743.

Urdea, M.S., 1988, Nucleic Acids Research, 11: 4937-4957.

Walker, G.T. et al., 1992, NAR 20: 1691-1696.

Walker, G.T. et al., 1992, PNAS. USA, 89: 392-396.

White, B.A. et al., 1997, Methods in Molecular Biology, 67, Humana Press, Towota.

Zhao, T.M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93(13):
6653-6658.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> WYETH

<120> SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADAS À DOENÇA DO
EMAGRECIMENTO DO LEITÃO (DEL)

<130> D17221

<150> FR 97 15396

<151> 1997-12-05

<160> 42

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1759

<212> ADN

<213> Circovírus DEL tipo A

<220>

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

<400> 1

```

accagcgcac ttcggcagcg gcagcaacctc ggcagcgtca gtgaaaatgc caagcaagaa 60
aagcggcccc caaccccata agaggtgggt gttcacccctt aataatcctt ccgaggagga 120
gaaaaacaaa atacggggagc ttccaatctc cctttttgat tattttgttt gtggcgagga 180
aggtttggaa gagggtagaa ctctcacctc ccaggggttt gogaattttg ctaagaagca 240
gacttttaac aaggtgaagt ggtattttgg tgcctcgtgc cacatcgaga aagcgaagg 300
aaccgaccag cagaataaag aatactgcag taaagaaggc cacatactta tcgagtgtgg 360
agctccgagg aaccagggga agcgcagcga cctgtctact gctgtgagta cctttttgga 420
gacggggtct ttggtgactg tagccgagca gtttctctga acgtatgtga gaaatctccg 480
ogggctggct gaacttttga aagtgagcgg gaagatgcag aagcgtgatt ggaagcagc 540
tgtacacgct atagtgggct cgcctcgttg tgggaagagc cagtgggccc gtaattttgc 600
tgagcctagg gacacctact ggaagcctag tagaaataag tggtaggatg gatatactgg 660
agaagaagtt gttgttttgg atgattttta tggctggtta ccttgggatg atctactgag 720
actgtgtgac cggatctcat tgactgtaga gactaaaggg ggtactgttc cttttttggc 780
ccgcagtatt ttgattacca gcaatcaggc ccccaggaa tggtagctct caactgtctg 840
cccagctgta gaagctctct atcggaggat tactactttg caattttggg aactgtctgg 900
agaaccaatc acggaggtac ccgaaggccg atttgaagca gtggaccac cctgtgccct 960
tttcccatat aaaataaatt actgagctct ttttgttatc acatcgtaat ggtttttatt 1020
tttattcatt tagagggctc ttcaggataa attctctgaa ttgtacataa atagtcaacc 1080
ttaccacata attttgggct gtggttgcat tttggagcgc atagcccagg cctgtgtgct 1140
cgacattggt gtgggtatth aaatggagcc acagctggtt tcttttatta tttggctgga 1200
accaatcaat tgtttggctc agctctggtt tgggggtgaa gtaacctggag tggtaggtaa 1260
agggctgect tatgggtggt cgggaggaat agttaatata ggggtcatag gccaagttgg 1320
tggaggggtt tacaaggtg gcataccaaga taacaacagt ggaccaaca cctctttgat 1380
tagaggtgat ggggtctctg gggtaaaatt catatttagc ctttotaata cggtagtatt 1440
ggaaaggtag gggtaggggg ttggtgcccg ctgagggggg gaggaactgg ccgatgttga 1500
atctcagctc gttaacattc caagatggct gogagtgtcc tctctctatg gtgagtacaa 1560
attctctaga aaggcgggaa ttgaagatac ccgtctttcg gcgccatctg taacggtttc 1620
tgaagggcgg gtgtaccaaa tatggtcttc tccggaggat gtttccaaga tggctgcggg 1680
ggcgggtccg tcttctgagg taacgcctcc ttggccacgt catcctataa aagtgaaga 1740
agtgcgctgc tgtagtatt

```

<210> 2

<211> 1759

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo A

<220> Cadeia polaridade - (5'-3')

<400> 2

```

aatactacag cagcgcactt ctttcacttt tataggatga cgtggccaag gaggcgttac 60
cgcagaagac ggaccgcgcc cgcagccat cttggaaaag tccctcggag aagaccatat 120
ttggtacacc cgccttcag aaaccgttac agatggcgcc gaaagacggg tatcttcaat 180
tcccgccttt ctagagaatt tgtactcacc ataagaggag gacactcgca gccatcttgg 240
aatgttaacg agctgagatt caacatcggc cagttcctcc cccctcagg cggcaccaac 300
cccctacccc tacctttcca atactaccgt attagaaagg ctaaatatga atttacccc 360
agagacccca tcacctctaa tcaaagaggt gttgggtcca ctggttattat ctgggatgcc 420
aactttgtaa cccctccac caacttggcc tatgaccctt atattaacta ctccctccgc 480
cacaccataa ggcagccctt tacctaccac tccaggtact tcacccccaa accagagcta 540
gaccaaaaca ttgattggtt ccagccaaat aataaaaaga accagctgtg gctccattta 600
aataccaca ccaatgtcga gcacacaggc ctgggctatg cgtccaaaa tgcaaccaca 660
gcccaaaatt atgtggtaa gttgactatt tatgtacaat tcagagaatt tatcctgaaa 720
gacctctaa atgataaaa ataaaaacca ttacgatgtg ataacaaaa agactcagta 780
atattttta tatgggaaaa gggcacaggg tgggtccact gcttcaaatc ggccttcggg 840
tacctccgtg gattgttctc cagcagttct ccaaaattgc aaagtagtaa tccctccgata 900
gagagcttct acagctggga cagcagttga ggagtaccat tccctggggg cctgattgct 960
ggtaatcaaa atactgcggg ccaaaaaagg aacagtacc cctttagtct ctacagtcaa 1020
tggataccgg tcacacagtc tcagtagatc atcccaaggt aaccagccat aaaaatcctc 1080
caaaaacaaca acttcttctc catgatatcc atcccaccac ttatttctac taggcttcca 1140
gtaggtgtcc ctaggctcag caaaattacg ggcctactgg ctcttcccac aaccgggagg 1200
gccactatg acgtgtacag ctgtcttcca atcacgctgc tgcacttcc cgtcacttt 1260
caaaagttca gccagccgcg ggaatttct cacatacgtt acaggaaaact gctcggctac 1320
agtcacaaa gacccgctct ccaaaaggg actcacagca gtagacaggt cgtcgcctt 1380
cccctggttc cgggagctc cacactcgat aagtatgtgg cttcttttac tgcagtattc 1440
tttattctgc tggtcggttc ctttcgcttt ctcgatgtgg cagcgggcac caaaatacca 1500
cttcaccttg ttaaaagtct gcttcttagc aaaattcgca aacccttga ggtgaggagt 1560
tctacctct tcaaacctt cctcgcaca acaaaaataa tcaaaaaggg agattggaag 1620
ctcccgtatt ttgttttct cctcctgga aggattatta aggggaaca cccacctctt 1680
atggggttgc ggcgccttt tcttgcttgg cttttcact gacgctgceg aggtgctgcc 1740
gctgccgaag tgcctggt 1759

```

<210> 3

<211> 939

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo A

<220>

<223> ORF1

<400> 3

```

atgccaaagca agaaaagcgg cccgcaaccc cataagaggt ggggtgtcac cottaataat 60
ccttccgagg aggagaaaaa caaaatacgg gagcttccaa tctcccttt tgattatftt 120
gtttgtggcg aggaagggtt ggaagagggg agaactcctc acctccaggg gtttgcgat 180
tttgctaaga agcagacttt taacaagggtg aagtggatatt ttgggtgccc ctgccacatc 240
gagaaaagcga aaggaaccga ccagcagaat aaagaatact gcagtaaaga agccacata 300
cttatcgagt gtggagctcc gcggaaccag gggaaagcgc ggcacctgtc tactgctgtg 360
agtacccttt tggagacggg gtctttgggt actgtagcog agcagtttcc tgtaacgtat 420
gtgagaaatt tccgcgggct ggctgaactt ttgaaagtga gcgggaagat gcagcagcgt 480
gatttgaaga cagctgtaca cgtcatagtg ggcccggccc gttgtgggaa gagccagtgg 540
gcccgtatatt ttgctgagcc tagggacacc tactgggagc ctagttagaa taagtgtgtg 600
gatggatatac atggagaaga agttgttgtt ttggatgatt tttatggctg gttaccttgg 660
gatgatctac tgagactgtg tgaccgggat ccattgactg tagagactaa aggggggtact 720
gttccctttt tggcccgcag tattttgatt accagcaatc aggcccccca ggaatggtac 780

```

```

tctcaactg ctgtcccagc tgtagaagct ctctatcgga ggattactac tttgcaattt 840
tgaagactg ctggagaaca atccacggag gtacccgaag gccgatttga agcagtggac 900
ccaccctgtg cccttttccc atataaaata aattactga 939

```

<210> 4

<211> 702

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo A

<220>

<223> ORF2

<400> 4

```

atgacgtggc caaggaggcg ttaccgcaga agacggacc gcccccgcag ccatcttggg 60
aacatctctc ggagaagacc atatfttggta cccccgcct tcagaaaccg ttacagatgg 120
cgccgaaaga cgggtatctt caattcccgc ctttctagag aatttgtact caccataaga 180
ggaggacact cgcagccatc ttggaatggt aacgagctga gattcaacat cggccagttc 240
ctccccccct caggcggcac caacccccta cccctacctt tccaatacta cagtattaga 300
aaggctaaat atgaatttta ccccagagac cccatcacct ctaatcaaag aggtgttggg 360
tccactgttg ttatcttggg tgccaaacttt gtaaccccct ccaccaactt ggcctatgac 420
ccctatatta actactctc ccgccacacc ataaggcagc cctttacctt ccactccagg 480
tacttcacc ccaaaaccaga gctagaccaa acaattgatt ggttccagcc aaataataaa 540
agaaaccagc tgtggctcca tttaaatacc cacaccaatg tegagcacac aggcctgggg 600
tatgcgctcc aaaatgcaac cacagcccaa aattatgtgg taaggtgac tatttatgta 660
caattcagag aatttatcct gaaagacct ctaaatgat aa 702

```

<210> 5

<211> 621

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo A

<220>

<223> ORF3

<400> 5

```
atgatatcca tcccaccact taktttctact aggettccag taggtgtccc taggctcagc 60
aaaatraagg gcccaactggc ttttcccaca aceggggcggg cccaetatga cgtgtacagc 120
tgttttccaa tcaogctgct gcatettccc getcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaattttct acatacgtta caggaaactg ctoggetaca gtcaccaaag acccctctc 240
caaaagggta ctcacagcag tagacaggtc gctgogcttc ccttggttcc gggagctcc 300
acactcgata agtatgtggc cttctttact gcagtattct ttattctgct ggtcggttcc 360
tttcgctttc tcgatgtggc agcgggcacc aaaataccac ttcacctgt taaaagtctg 420
cttcttagca aaattcgcaa acccctggag gtgaggagt ctaccctctt ccaaaccttc 480
ctcgccacaa acaaaataat caaaaaggga gattggaag tcccgattt tgtttttctc 540
ctcctcggaa ggattattaa gggatgaac ccacctctta tggggttgcg ggccgctttt 600
cttgcttggc attttcaactg a 621
```

<210> 6

<211> 312

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo A

<400> 6

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

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

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

Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys
 50 55 60
 Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg Cys His Ile
 65 70 75 80
 Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys
 85 90 95
 Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly Lys
 100 105 110
 Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe
 130 135 140
 Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg
 145 150 155 160
 Asp Trp Lys Thr Ala Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly
 165 170 175
 Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp
 180 185 190
 Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val
 195 200 205
 Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu
 210 215 220
 Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala Pro
 245 250 255
 Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr
 260 265 270
 Arg Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser
 275 280 285
 Thr Glu Val Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala
 290 295 300
 Leu Phe Pro Tyr Lys Ile Asn Tyr
 305 310

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo A

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Leu Lys Asp Pro Leu Asn Glu
225 230

<210> 8

<211> 206

<212> PRI

<213> Circovirus DEL tipo A

<400> 8

Met Ile Ser Ile Pro Pro Leu Ile Ser Thr Arg Leu Pro Val Gly Val
1 5 10 15
Pro Arg Leu Ser Lys Ile Thr Gly Pro Leu Ala Leu Pro Thr Thr Gly
20 25 30
Arg Ala His Tyr Asp Val Tyr Ser Cys Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
35 40 45
Leu Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser His
50 55 60
Ile Arg Tyr Arg Lys Leu Leu Gly Tyr Ser His Gln Arg Pro Arg Leu
65 70 75 80
Gln Lys Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Ala Ala Leu Pro Leu Val
85 90 95
Pro Arg Ser Ser Thr Leu Asp Lys Tyr Val Ala Phe Phe Thr Ala Val
100 105 110
Phe Phe Ile Leu Leu Val Gly Ser Phe Arg Phe Leu Asp Val Ala Ala
115 120 125
Gly Thr Lys Ile Pro Leu His Leu Val Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys
130 135 140
Ile Arg Lys Pro Leu Glu Val Arg Ser Ser Thr Leu Phe Gln Thr Phe
145 150 155 160
Leu Ala Thr Asn Lys Ile Ile Lys Lys Gly Asp Trp Lys Leu Pro Tyr
165 170 175
Phe Val Phe Leu Leu Leu Gly Arg Ile Ile Lys Gly Glu His Pro Pro
180 185 190
Leu Met Gly Leu Arg Ala Ala Phe Leu Ala Trp His Phe His
195 200 205

<210> 9

<211> 1767

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo B

<220> Cadeia polaridade + (5'-3')

<400> 9

```
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcggg aaaaacccc ataaaagggt ggtgttcaact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcgaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatctta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttogetaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggatatt ggtgcccgc tgcacatcg 300
agaaagcga aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagttaaaga ggcaacttac 360
tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttgtt ggagagcggg agtctgggtg ccgttgca gaagcacctc gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcccggctg gctgaacttt taaaagtggc cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggcacactgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagaccgc gaaaccacat actggaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggaagaa gtggttgta ttgatgact ttatggctgg ctgcccctgg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctctttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatctt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt tttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtcttataaa ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgatatata ctgttttoga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tggctctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtaccg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtgttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct aataaacag cactggagcc 1380
```

```
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgac cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cggcaggag ggcgtctga ctgtggttcg 1560
cttgacagta tatccgaagg tgcgggagag gcgggtgttg aagatgccat ttttctttct 1620
ccagcggtaa cgytggcggg ggtggacgag ccaggggccc cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgccc gggcgggtgc ttottcttcg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaga agtgcgctgt aagtatt 1767
```

<210> 10

<211> 1767

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo B

<220>

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

<400> 10

```
aatactttaca ggcgactttct ttcgttttca gatatgaagt atccaaggag gcgttaccga 60
agaagaagac accgcccccg cagccatctt ggccagatcc tccgcccggc cccctggctc 120
gtccaccccc gccaccggtt ccgctggaga aggaaaaatg gcctcttcaa cccccgcctc 180
tcccgcacct tcggatatac tgtcaagcga accacagtca gaacgcccctc ctgggcccgtg 240
gacatgatga gattcaatat taatgacttt ctccccccag gagggggggtc aaacccccgc 300
tctgtgccct ttgaatacta cagaataaga aaggttaagg ttgaattctg gccctgctcc 360
ccgatcccc aggggtgacag gggagtgggc tccagtctct ttattttaga tgataacttt 420
gtaacaaaag ccacagccct cacctatgac cccatgtaa actactctc ccgcatacc 480
ataaccacgc ccttctctca ccactccgg tactttacc ccaaacctgt cctagatttc 540
actattgatt acttccaacc aaacaacaaa agaaaccagc tgtggtgag actacaaact 600
gctggaaatg tagaccagc aggcctcggc actgcgttcg aaaacagtat ataccgaccg 660
gaatacaata tccgtgtaac catgatgta caatcagag aatttaattt taaagacccc 720
ccacttaacc cttaatgaat aataaaaacc attacgaagt gataaaaaag actcagtaat 780
ttatttcata tggaaattca gggcatgggg gggaaaagggt gacgaactgg cccccctcct 840
ccgtggattg ttctgtagca ttcttccaaa ataccaagga agtaatectc cgataaagag 900
cttctacagc tgggacagca gttgaggagt accattccaa cggggtctga ttgctggtaa 960
tcagaatact gggggccaaa aaaggtacag ttccaacctt agtctctaca gtcaatggat 1020
atcgatcaca cagtctcagt agatcatccc agggcagcca gccataaaaag tcatcaataa 1080
caaccacttc ttcaccatgg taaccatccc accacttgtt tctaggtggt ttccagtatg 1140
tggtttccgg gtctgcaaaa tttagcagccc atttgctttt accacacca ggtggcccca 1200
caatgacgtg tacattagtc ttccaatcac gcttctgcat tttcccgctc actttcaaaa 1260
gttcagccag cccgggaaa tttctgacaa acgttacagg gtgctgctct gcaacggtea 1320

ccagactccc gctctccaac aaggtaactca cagcagtaga caggtaactc cgttgctcct 1380
gagatctagg agctccacac tccatcagta agttgcttc tttactgcag tattctttat 1440
tctgctgac tgttcctttc gctttctcga tgtggcagcg ggcacccaaa taccacttca 1500
ctttattaaa agtctgcttc ttcacaaaat tagcgaaccc ctggaggtga ggtgttctgc 1560
cttcctcatt accctcctcg ccaacaataa aataatcaaa taggyatatt ggaagatccc 1620
gtattttctt gcgctcgtct tcggaaggat tattcagagt gaacaccac cttttatggg 1680
gttgggggtc gcttcttcca ttctctttgc tgggcatgtt gctgctgagg tgctgccgag 1740
gtgctgcccg tgcgaagtg cgtggt 1767
```

<210> 11

<211> 945

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo B

<220>

<223> ORF1

<400> 11

```

atgcccagca agaagaatgg aagaagcggg ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact 60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcgaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct 120
gattatctta ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg 180
ttcgetaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggatatt ggggtgcccc 240

```

```

tgccacatcg agaaaagcga aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagttaagaa 300
ggcaacttac tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct 360
actgctgtga gtaccttgtt ggagagcggg agtctgtgga ccgttgcaga gcagcacctc 420
gtaacgcttg tcagaaatct ccgctgggctg gctgaacttt tgaaagtgag cgggaaaatg 480
cagaagcgtg attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa 540
agcaaatggg ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac 600
aagtgggtgg atggttacca tgggaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg 660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatatc cattgactgt agagactaaa 720
ggtggaactg tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgctg 780
gaatggtaact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc ttatcggag gattacttcc 840
ttgtatcttt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc 900
cttccccccc catgcccctga atttccatat gaaataaatt actga 945

```

<210> 12

<211> 702

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo B

<220>

<223> ORF2

<400> 12

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gcccccgag ccactctggc 60
cagatcctcc gccgcgcgcc ctggctcgtc ccccccgcc accggtaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcacctcg gatatactgt caagcgaacc 180
acagtcagaa cgcctctctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccagggag gggggtcaaa cccccgctct gtgcccttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccccg atcacccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgctgtta ttttagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaaact actcctcccg ccataaccata acccagccct tctcctacca ctcccggctc 480
tttaccceca aacctgtcct agatttcact attgattact tccaaacaaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttaa agacccccca cttaaccctt aa 702

```

<210> 13

<211> 315

<212> ADN

<213> Circovirus DEL tipo B

<220>

<223> ORF3

<400> 13

```
atggttaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtggttt ccgggtctgc 60
aaaatttagca gcccatctgc ttttaccaca cccaggtagc cccacaatga cgtgtacatt 120
agtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagtccag ccagcccgcg 180
gaaatttctg acaaacgta cagggtagct ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtctc 240
caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccctgagatc taggagctcc 300
acactccatc agtaa                                     315
```

<210> 14

<211> 314

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 14

```
Met Pro Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg
  1           5           10           15

Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
           20           25           30

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

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

Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Leu Gly Ala Arg
  65           70           75           80

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

Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
 100           105           110
```

Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu
 115 120 125
 Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
 130 135 140
 Arg Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
 145 150 155 160
 Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro
 165 170 175
 Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
 180 185 190
 Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
 195 200 205
 Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
 210 215 220
 Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
 245 250 255
 Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
 260 265 270
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
 275 280 285
 Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
 290 295 300
 Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
 305 310

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 15

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Phe Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Phe Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
 225 230

<210> 16

<211> 104

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 16

Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Thr Thr Pro Arg
 20 25 30
 Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Ser Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
 35 40 45
 Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
 50 55 60
 Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ser Arg Ser Ser Thr Leu His Gln
 100

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 17

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

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 18

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

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 19

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

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Circovirus DEL tipo B

<400> 20

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

<210> 21

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 21

tgtggcga 8

<210> 22

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 22

agtttcct 8

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 23

tcatttagag ggtctttcag 20

<210> 24

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 24

Gtcaacct 8

<210> 25

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 25

gtggttgc 8

<210> 26

<211> 8
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 26
Agcccagg 8

<210> 27
<211> 8
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 27
Ttggctgg 8
<210> 28
<211> 12
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 28
tctagctctg gt 12

<210> 29
<211> 12
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 29
atctcagctc gt 12

<210> 30
<211> 12

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 30

tgtcctcctc tt 12

<210> 31

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 31

tctctaga 8

<210> 32

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 32

tgtaccaa 8

<210> 33

<211> 8

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 33

Tccgtctt 8

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 34

gtgtgctcga cattggtgtg 20

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 35

tggaatgtta acgagctgag 20

<210> 36

<211> 20

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 36

ctcgcagcca tcttggaatg 20

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 37

cgcgcgtaat acgactcact 20

<210> 38

<211> 26

<212> ADN

<213> Circovirus

<400> 38
cctgtctact gctgtgagta ccttgt 26

<210> 39
<211> 26
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 39
gcagtagaca ggtcactccg ttgtcc 26

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 40
tggaatgtta actacctcaa 20

<210> 41
<211> 23
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 41
ggcggcgcca tctgtaacgg ttt 23

<210> 42
<211> 23
<212> ADN
<213> Circovirus

<400> 42
gatggcgccg aaagacgggt atc 23

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de vacina compreendendo um polipéptido isolado codificado por uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 12, que corresponde a ORF'2 de um circovírus DEL do tipo B.
2. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida sequência nucleotídica ter pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID n° 12.
3. Composição de vacina compreendendo um polipéptido isolado de uma sequência possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID NO: 15, que corresponde a um ORT'2 de um circovírus DEL do tipo B.
4. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a sequência do referido polipéptido ter pelo menos 95 % de identidade com a sequência SEQ ID n° 15.
5. Uma composição de vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a referida sequência incluir a sequência SEQ ID No. 17.
6. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a referida sequência incluir a sequência SEQ ID No. 18.
7. Uma composição de vacina de acordo com a reivindicação 3 caracterizado em que a referida sequência incluir a sequência SEQ ID No. 19.

8. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a referida sequência incluir a sequência SEQ ID N°. 20.

9. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, compreendendo ainda pelo menos um adjuvante, veículo farmacêuticamente aceitável, ou uma combinação dos mesmos.

10. Composição de vacina compreendendo um vector para a expressão de um polipéptido isolado codificado por uma sequência nucleótidos possuindo pelo menos 90 % de identidade com a sequência SEQ ID N° 12, que corresponde a um ORF'2 circovírus DEL do tipo B.

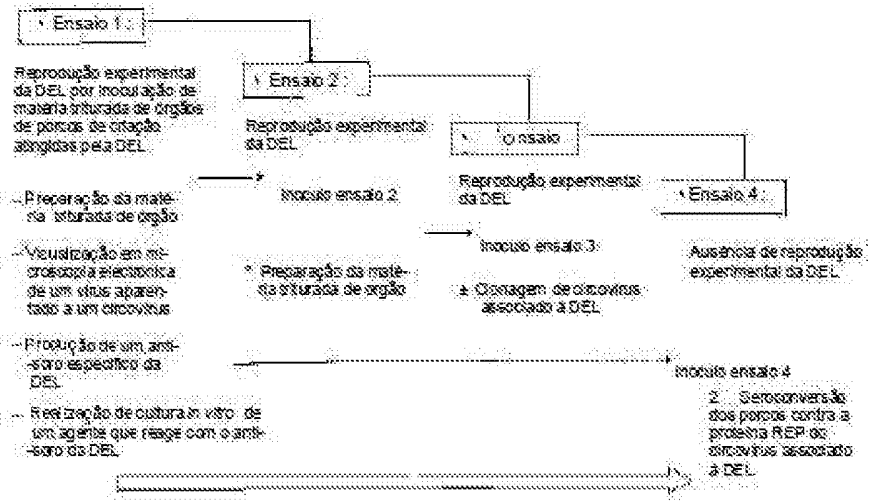


FIGURA 1

[

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Thr Ser Phe Ala Leu Cys
 Tsp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Arg *** His Phe His Trp Ala
 Gly Ala Cys Cys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Asp Thr Phe Glu Gly Leu
 ...
 3 TGG TCC CGT GAA CGC CTC CCC GTC CCG GAC CCG TCC CAG TCA CTT TTA CGG TTC
 ...
 5 ACC AGE GCA CTT KSC CAG CGG CAG CAC CTC CGC ACC GTC AGT GAA AAT GCI AAG
 ...
 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Val Ser Glu Asn Ala Lys
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Ser Val Lys Met Pro Ser
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln Arg Gln *** Lys Cys Gln Ala
 Ser Phe Arg Gly Ala Val Gly Tyr Ser Thr Pro Thr *** Gly *** Tyr Asp Lys
 Leu Phe Ala Ala Arg Leu Gly Met Leu Pro Pro His Glu Gly Lys Ile Ile Arg
 Leu Phe Leu Pro Gly Cys Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val Arg Leu Leu Gly
 ...
 GTT CTT TTC CCC GGG CGT TGG GGT ATT CTC CAC CCA CAA GTC GGA ATT ATT ACG
 ...
 CAA GAA AAG CGC CCC GCA ACC CCA TAA GAC GTG GGT GTT CAC CCT TAA TAA TCC
 ...
 Gln Glu Lys Arg Pro Ala Thr Pro *** Glu Val Gly Val His Pro *** *** Ser
 Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro
 Arg Lys Ala Ala Arg Asn Pro Ile Arg Gly Gly Cys Ser Pro Leu Ile Ile Leu
 Arg Pro Pro Ser Phe Cys Phe Val Pro Ala Glu Leu Arg Gly Lys Gln Asn Asn
 Gly Leu Val Ser Phe Val Phe Tyr Pro Leu Lys Trp Asp Gly Lys Lys Ile Ile
 Gly Ser Ser Ser Phe Phe Leu Ile Arg Ser Ser Gly Ile Glu Arg Lys Ser ***
 ...
 AAG CCT CCT CCT CTT TTT GTT TTA TGC CCT CGA AGG TTA CAG GCA AAA ACT AAT
 ...
 TTC CCA GCA GSA GAA AAA CAA AAT ACC GGA GGT TCC AAT CTC CTT TTT TGA TTA
 ...
 Phe Arg Gly Gly Glu Lys Gln Asn Thr Gly Ala Ser Asn Leu Pro Phe *** Leu
 Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr
 Pro Arg Arg Arg Lys Thr Lys Tyr Gly Ser Pro Gln Ser Pro Phe Leu Ile Ile
 Gln Lys His Arg Pro Leu Asn Pro Leu Pro Tyr Pro Glu Glu Gly Gly Pro Thr
 Lys Asn Thr Ala Leu Phe Thr Gln Phe Leu Thr Ser Ser Arg Val Glu Leu Pro
 Lys Thr Gln Pro Ser Ser Pro Lys Ser Ser Pro Leu Val Gly *** Arg Trp Pro
 ...
 AAA ACA AAC ACC GCT CCT TCC AAA CTT TCT CCC ATC TTG AGC ACT GGA GGT CCC
 ...
 TTT TAT TTG TGC CGA GAA AGC TTT GGA GGA GGG TAC AAC TCC TCA CTT CGA GGC
 ...
 Pro Cys Leu Thr Arg Gly Arg Phe Gly Arg Gly *** Asn Ser Ser Pro Pro Gly
 Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Thr Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly
 Leu Phe Val Ala Arg Lys Val Trp Lys Arg Val Glu Leu Leu Thr Ser Arg Gly
 ...
 Gln Ser Asn Gln *** Ser Ala Ser Lys *** Cys Pro Ser Thr Thr Asn Gln His
 Lys Arg Ile Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys Val Leu His Leu Pro Ile Lys Thr
 Asn Ala Phe Lys Ala Ser Pro Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe His Tyr Lys Pro
 ...
 CAA ACC CTT AAA ACC ATT CTT CTT CTC AAA ATT GTT CCA CTT CAC CAY AAA ACC
 ...
 GTT TCC GAA TTT TCC TAA CAY CCA GAC TTT TAA CAA GGT GAN GTC GTA TTT TCG
 ...
 Val Cys Gly Phe Cys *** Glu Ala Asp Phe *** Gln Gly Glu Val Val Phe Trp
 Ser Ala Asn Phe Ala Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly
 Leu Arg Thr Leu Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Arg *** Ser Gly Ile Leu Val

FIGURA 2

Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Ser
 Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Gly Val Leu Leu Ile Phe Phe Val
 Ala Arg Glu Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser Trp Cys Phe Leu Ser Tyr
 ...
 ACC GGC GAC GGT GTA GCT CTT TCG CTT TCC TTA GCT GGT CCG CTT ATT TCC TAT
 299 284 297 306 315 324
 TCC CCC CTG CCA CAT CGA GAA AGC GAA AGG GAG CGA CCA GCA GAA TAA AUA ATA
 ...
 Cys Pro Leu Phe His Arg Glu Ser Gly Arg Asn Arg Pro Ala Glu *** Arg Ile
 Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asn Glu Gln Asn Lys Glu Tyr
 Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Pro Thr Ser Arg Ala Lys Asn Thr
 ...
 Cys Tyr Leu Leu Gly Cys Val *** Arg Thr His Leu Glu Ala Ser Gly Pro Ser
 Ala Thr Phe Phe Ala Val Tyr Lys Asp Leu Thr Ser Ser Arg Pro Val Leu Pro
 Glu Leu Leu Ser Pro Trp Met Ser Ile Ser His Pro Ala Gly Arg Phe Trp Pro
 ...
 CAC GTC ATT TCT TCC GGT GTA TCA ATA GCT CAC ACC TCC ACC CCG CTT GGT CCC
 333 342 351 360 369 378
 CTG CAG TAA AGA AGC CCA CAT ACT TAT CGA GTC TCC AGC TCC CCG CAA CCA GGG
 ...
 Leu Gln *** Arg Arg Pro His Thr Tyr Arg Val Trp Ser Ser Ala Glu Pro Gly
 Cys Ser Lys Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly
 Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Val Glu Glu Arg Gly Thr Arg Gly
 ...
 Ala Cys Arg Gly Thr *** Gln Glu Ser Tyr Gly Lys Pro Ser Pro Thr Lys Pro
 Leu Ala Ala Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Lys Gln Leu Arg Pro Arg Gln
 Phe Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Arg Lys Ser Val Pro Asn Lys
 ...
 CTT GCG GTC GCT GAA CAG ATG ACC ACA CTC ATC GCA AAA CCT CTG ECC CAG AAA
 387 396 405 414 423 432
 GAA CCG CAG CCA CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CCT TTY CGA GAC CCG GTC TTT
 ...
 Glu Ala Gln Arg Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Pro Phe Gly Ala Gly Val Phe
 Lys Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Thr Gly Ser Leu
 Ser Ala Ala Thr Cys Leu Leu Leu *** Val Pro Phe Trp Arg Asp Gly Leu Trp
 ...
 Ser Gln Leu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Thr His Ser Phe Asn Gly Arg Ala Pro
 His Ser Tyr Gly Leu Leu Lys Arg Thr Arg Ile His Ser Ile Glu Ala Pro Gln
 Thr Val Thr Ala Ser Cys Asn Gly Thr Val Tyr Thr Leu Phe Lys Arg Pro Ser
 ...
 CCA CTG ACA TCG GCF CCF CAA AGG ACA TGC CAT ACC CCG TTT AAA GGC GCG CCA
 441 450 459 468 477 486
 GGT GAC TGT AGC CCA CCA CTF TCC TCT AAC CCA TGT GAC AAN TTT CCG CCG CCF
 ...
 Gly Asp Cys Ser Arg Ala Val Ser Lys Asn Val Cys Glu Lys Phe Pro Arg Ala
 Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe Arg Gly Leu
 *** Leu *** Pro Ser Xaa Phe Leu *** Arg Asn *** Glu Thr Ser Ala Glu Tyr
 ...
 Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala His Asn Ser Ser Leu Gln
 Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Leu His Leu Leu Thr Ile Pro Leu Cys Ser
 Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Cys Arg Ser Gln Phe Val Ala
 ...
 GCG ACT TGA AAN CTT TCA CTC GCC CTT CTA CBT CGT CCG AET AAC CTT CTG CCG
 495 504 513 522 531 540
 GCG TCA ACT TTT GAA AGT GAG LSC GAA GAT CCA GCA GCG TGA TTC GAA GAC AGC
 ...
 Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asn Ala Ala Ala *** Leu Glu Asp Ser
 Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg Asp Trp Lys Thr Ala
 Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Glu Arg Lys Ser Ser Val Ile Gly Arg Gln Leu

FIGURA 2 (cont. 1)

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

Gln Gln Ala *** Pro Cys Arg Ser Ser Ala *** Tyr Phe Tyr Thr Thr Pro His
 Lys Ala Ser Gly Leu Ser Val *** Gln Phe Gly Leu Leu Phe Leu His His Ser
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 AAA ACC ACT CCG ATC CCC GTC GAT GAC CTT CCG ATC ATC TTT AAT CAC CAC CCT
 603 612 621 630 639 648
 TTT TGC TGA CCC TAG GGA CAC GTA CTC GAA GCG TAG TAG AAA TAA GTG GTG GGA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Phe Cys *** Ala *** Gly His Leu Leu Glu Ala *** *** Lys *** Val Val Gly
 Phe Ala Glu Phe Arg Asp Thr Tyr Trp Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp
 Leu Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Gly Ser Leu Val Glu Ile Ser Gly Gly Met

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

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

Pro Tyr Glu Glu Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Lys Ser *** Trp Cys Asp Pro Gly
 Pro Thr Ser Asn Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly Ala Ile Leu Gly
 Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Lys Ile Val Leu Leu *** Ala
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TCC CCC ATC ACA AGG AAA AAA CCG GCG GTC ATA AAA GTA ATC CTC GGT AGT CCC
 765 774 783 792 801 810
 AGG GGG TAC TGT TCC TTT TTT GCG GCG CAG TAT TTT GAT TAC CAG CAA TCA GCG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Arg Gly Tyr Cys Ser Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Phe Asp Tyr Gln Gln Ser Gly
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala
 Gly Val Leu Phe Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu Pro Ala Ile Arg Pro

FIGURA 2 (cont. 2)

Gly Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu Leu Gln Arg Asp Ser
 Gly Leu Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe Ser Glu Ile Pro
 Gly Trp Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser Ala Arg *** Arg
 GGC GGT CCT TAC CAT GAG GAG TTC ACC ACA GGG TGG ACA TCT TCG ACA CAT GGC
 829 829 837 845 855 864
 CCC CCA GCA ATG GTA CTC CTC AAC TCC TGT CCC ACC TGT AGA ACC TCT CTA TCG
 Pro Pro Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser
 Pro Glu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr Arg
 Pro Arg Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu *** Lys Leu Ser Ile Gly
 Ser *** *** Lys Ala Ile Lys Ser Ser Gln Gln Leu Val Ile Trp Pro Pro Val
 Pro Asn Ser Ser Gln Leu Lys Pro Leu Ser Ser Ser Phe Leu Gly Arg Leu Tyr
 Leu Ile Val Val Lys Cys Asn Gln Phe Val Ala Pro Ser Cys Asp Val Ser Thr
 CTC CTA ATG ATG AAA CGT TAA AAC CTT CTG ACC ACC TGT TGT TAG GTG CCT CCA
 873 882 891 900 909 918
 GAG CAT TAC TAC TTT GCA ATT TTG GAA CAC TCC TCG AGA ACA ATC CAC GGA GGT
 Glu Asp Tyr Tyr Phe Ala Ile Leu Glu Asp Cys Trp Arg Thr Ile His Gly Gly
 Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser Thr Glu Val
 Gly Leu Leu Trp Cys Asn Phe Gly Arg Leu Leu Glu Leu Ala Pro Arg Arg Tyr
 Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Gly Val Arg His Gly Lys Gly Met Tyr Phe
 Gly Phe Ala Ser Lys Phe Cys His Val Trp Gly Thr Gly Lys Glu Trp Ile Phe
 Gly Ser Pro Arg Asn Ser Ala Thr Ser Gly Gly Gln Ala Arg Lys Gly Tyr Leu
 TGG GGT TCC GGC TAA ACT TCG TCA CCT GGG TGG GAC ACC GGA AAA GCG TAT ATT
 927 935 945 954 963 972
 ACC CGA AGG CCC ATT TGA AGC AGT GGA CCC ACC CTC TGC CCT TTT CCC ATA TAA
 Thr Arg Arg Pro Ile *** Ser Ser Gly Pro Thr Leu Cys Pro Phe Pro Ile ***
 Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala Leu Phe Pro Tyr Lys
 Pro Lys Ala Asp Leu Lys Gln Trp Thr His Pro Val Pro Phe Ser His Ile Lys
 Leu Asn Ser Leu Arg Lys Gln *** *** Met Thr Ile Thr Lys Ile Lys Ile ***
 Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asn Asp Cys Arg Leu Pro Lys *** Lys *** Glu
 Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Thr Ile Val Asp Tyr His Asn Lys Asn Lys Asn
 TTA TTT AAT GAC TCA GAA AAA ACA ATA CTC TAG CAT TAC CAA AAA TAA AAA TAA
 981 990 999 1008 1017 1026
 AAT AAA TTA CTC AGT CTT TTT TGT TAT CAC ATC GAA ATG GAT TTT ATT TTT ATT
 Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Cys Tyr His Ile Val Met Val Phe Ile Phe Ile
 Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Val Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Phe Leu Phe
 *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Phe Tyr Phe Tyr Ser
 Lys Ser Pro Arg Glu Pro Tyr Ile Arg Gln Ile Thr Cys Leu Tyr Asp Val Lys
 Asn Leu Pro Asp Lys Leu Ile Phe Glu Arg Phe Gln Val Tyr Ile Thr Leu Arg
 Met *** Leu Thr Lys *** Ser Leu Asp Glu Ser Asn Tyr Met Phe Leu *** Gly
 GTA AAT CTC CCA GAA AGT CCT ATT TAA GAG ACT TAA CAT GAA TTT ATC ACT TCG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 CAT TTA GAG GGT TTT TCA GGA TAA ATT CTC TCA ATT GTA CAT AAA TAC TCA ACC
 His Leu Glu Gly Leu Ser Gly *** Ile Leu *** Ile Val His Lys *** Ser Thr
 Ile *** Arg Val Phe Gln Asp Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile Asn Ser Gln Pro
 Phe Arg Gly Ser Phe Arg Ile Asn Ser Leu Asn Cys Thr *** Ile Val Asn Leu

FIGURA 2 (cont. 3)

Gly Cys Leu Lys Pro Ser His Asn Cys Lys Pro Ala Cys Leu Gly Pro Arg His
Val Val Tyr Asn Gln Ala Thr Thr Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Gly Leu Gly Thr
*** Trp Met Ile Lys Pro Gln Pro Gln Met Lys Ser Arg Met Ala Trp Ala Gln
...
AAT GGT GTA TTA AAA CCC GAC ACC AAC GTA AAA CCT CCG GTA TCG GGG CCG GAC
1080 1098 1107 1116 1125 1134
TTA CCA CAT AAT TTT GGG CCG TGG TTG CAT TTT GGA GCG CAT AGC CCA GCG CTG
...
Leu Pro His Asn Phe Gly Leu Trp Leu His Phe Gly Ala His Ser Pro Gly Leu
Tyr His Ile Ile Leu Gly Cys Gly Cys Ile Leu Gln Arg Ile Ala Gln Ala Lys
Thr Thr *** Phe Trp Ala Val Val Ala Phe Trp Ser Ala *** Pro Arg Pro Val
...
Ala Arg Cys Gln His Pro Tyr Lys Phe Pro Ala Val Ala Pro Lys Lys *** ***
His Glu Val Asn Thr His Thr Asn Leu His Leu Trp Leu Gln Asn Arg Lys Asn
Thr Ser Ser Met Pro Thr Pro Ile *** Ile Ser Gly Cys Ser Thr Glu Lys Ile
...
ACA GGA GGT GTA ACC ACA CCC ATA AAT TTA CCT CCG TGT CGA CCA AAG AAA ATA
1143 1152 1161 1170 1179 1188
TGT CCT CCA CAT TCC TGT GGG TAT TTA AAT GGA GCG ACA GCT GGT TTC TTT TAT
...
Cys Ala Arg His Trp Cys Gly Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Ala Gly Phe Phe Tyr
Val Leu Asp Ile Gly Val Gly Ile *** Met Glu Pro Gln Leu Val Ser Phe Ile
Cys Ser Thr Leu Val Trp Val Phe Lys Trp Ser His Ser Trp Phe Leu Leu Leu
...
Lys Ala Pro Val Leu *** Asn Asn Pro Arg Ala Arg Thr Gln Pro His Leu Val
Asn Pro Gln Phe Trp Asp Ile Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys Pro Thr Phe Tyr
Ile Gln Ser Ser Gly Ile Leu Gln Lys Thr *** Ser Gln Asn Pro Pro Ser Thr
...
ATA AAC GGA CCT TCG TTA GTT AAC AAG CCA GAT CGA GAC CAA ACC CCC ACT TCA
1197 1206 1215 1224 1233 1242
TAT TCG GGT CGA ACC AAT CAA TTG TTT GGT CTA GCT CTG GTT TCG GCG TGA AGT
...
Tyr Leu Ala Gly Thr Asn Gln Leu Phe Gly Leu Ala Leu Val Trp Gly *** Ser
Ile Trp Leu Glu Pro Ile Asn Cys Leu Val *** Leu Trp Phe Gly Gly Glu Val
Phe Gly Trp Asn Gln Ser Ile Val Trp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Val Lys Tyr
...
Gln Leu Pro Leu Tyr Leu Ala Ala Lys His His Pro Pro Leu Leu Leu *** Tyr
Arg Ser His Tyr Thr Phe Pro Gln Arg Ile Thr His Arg Ser Ser Tyr Asn Ile
Gly Pro Thr Thr Pro Leu Pro Ser Gly *** Pro Phe Ala Pro Pro Thr Thr Leu
...
TGG ACC TCA CCA TCC ATT TCC CGA CCG AAT ACC ACA CCG CCC TCC TCA TCA ATT
1251 1260 1269 1278 1287 1296
ACC TCG AGT GGT AGG TAA AGG GCT GCC TTA TGG TGT GCC GCG AGC AGT AGT TAA
...
Thr Trp Ser Gly Arg *** Arg Ala Ala Leu Trp Cys Gly Gly Arg Ser Ser ***
Pro Gly Val Val Gly Lys Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala Gly Gly Val Val Asn
Leu Glu Trp *** Val Lys Gly Cys Leu Met Val Trp Arg Glu Glu *** Leu Ile
...
Leu Pro *** Leu Gly Leu Gln His Leu Pro Asn Cys Leu Gln Lys Gly Leu Tyr
Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Asn Thr Ser Pro Thr Val Phe Asn Ala Asp Leu Ile
Ile Pro Thr Met Pro Trp Thr Pro Pro Pro Pro *** Leu Thr Pro Met Trp Ser
...
ATA TCC CCA GTA TCC GGT TCA ACC ACC TCC CCC AAT GTT TCA ACC GTA GGT TCT
1305 1314 1323 1332 1341 1350
TAT ACC GGT CAT AGG CCA ACT TCC TCC AGG CCG TTA CAA AGT TGG CAT CCA ACG
...
Tyr Arg Gly His Arg Pro Ser Trp Trp Arg Gly Leu Ala Ser Thr Met Pro Arg
Ile Gly Val Ile Gly Gln Val Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Val Gly Ile Gln Asp
*** Gly Ser *** Ala Lys Leu Val Gln Gly Val Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ile

FIGURA 2 (cont. 4)

Cys Cys His Val Trp Cys Arg Lys Ser *** Leu His His Pro Arg Gln Pro Leu
 Val Val Thr Ser Gly Val Gly Arg Gln Asn Ser Thr Ile Pro Asp Arg Pro Tyr
 Leu Leu Leu Pro Gly Leu Val Glu Lys Ile Leu Pro Ser Pro Thr Glu Pro Thr

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

 Ile *** Ile *** Gly Lys *** Tyr Pro Leu Ile Pro Phe Thr Pro Thr Pro Pro
 Phe Gly Tyr Lys Ala Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Leu Pro
 Pro Asn Met Asn Leu Arg Glu Leu Val Thr Thr Asn Ser Leu Tyr Pro Tyr Pro

 TTT TAA GTA TAA ATC GGA GAG ATT ATC CCA TCA TAA CCT TTC CAT CCG CAT CCG
 1412 1421 1431 1440 1449 1458
 AAA ATT CAT ATT TAG CCT TTC TAA TAC GGT AGT ATT GGA AAG GTA GGG GTA GGG
 Cys Ile His Ile *** Pro Phe *** Tyr Gly Ser Ile Gly Lys Val Gly Val Gly
 Lys Phe Ile Phe Ser Leu Ser Asn Thr Val Val Leu Glu Arg *** Gly *** Gly
 Asn Ser Tyr Leu Ala Phe Leu Ile Arg *** Tyr Trp Lys Gly Arg Gly Arg Gly

 Gln His Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Pro Arg His Gln Ile Glu Ala Arg ***
 Asn Thr Gly Gly Ser Pro Pro Leu Phe Gln Gly Ile Asn Phe Arg Leu Glu Asn
 Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ser Thr Ser Asp *** Ser Thr

 CCA ACC ACC GCG GAC TCC CCC CCT CCT TGA CCG CCT ACA ACT TAG AGT CCA GCA
 1467 1476 1485 1494 1503 1512
 GGT TCG TCC CCC CTC AGG GCG GCA CCA ACT GGC CCA TGT TGA ATC TCA GCT CGT
 Gly Trp Lys Arg Leu Arg Gly Gly Gly Thr Gly Arg Cys *** Ile Ser Ala Arg
 Val Gly Ala Ala *** Gly Gly Glu Glu Leu Ala Asp Val Glu Ser Gln Leu Val
 Leu Val Pro Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp Pro Met Leu Asn Leu Ser Ser Leu

 Cys Glu Leu Ile Ala Ala Leu Thr Arg Arg Lys His His Thr Cys Ile Arg ***
 Val Asn Trp Ser Pro Gln Ser His Gly Gly Arg Ile Thr Leu Val Phe Glu Arg
 Leu Met Gly Leu His Ser Arg Thr Asp Glu Glu *** Pro Ser Tyr Leu Asn Glu

 ATT GTA AGG TTC TAC CCA CCG TCA CAG GAG GAT ACC ACT CAT GGT TAA GAG
 1521 1530 1539 1548 1557 1566
 TAA CAT TCC AAG ATG GCT GCG AGT GTC CTC CTC TTA TGG TGA GGA GAN ATT CTC
 *** His Ser Lys Met Ala Ala Ser Val Leu Leu Leu Trp *** Val Gln Ile Leu
 Asn Ile Pro Arg Pro Leu Arg Val Ser Ser Ser Tyr Gly Glu Tyr Lys Phe Ser
 Thr Phe Gln Asp Gly Cys Glu Cys Pro Pro Leu Met Val Ser Thr Asn Ser Leu

 Phe Pro Pro Phe Gln Leu Tyr Gly Asp Lys Pro Ala Met Gln Leu Pro Lys Gln
 Ser Leu Arg Ser Asn Phe Ile Gly Thr Lys Arg Arg Trp Arg Tyr Arg Asn Arg
 Leu Phe Ala Pro Ile Ser Ser Val Arg Arg Glu Ala Gly Asp Thr Val Thr Glu

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

FIGURA 2 (cont. 5)

```

Leu Arg Pro Thr Gly Phe Ile Thr Lys Glu Pro Pro His Lys Pro Ser Pro Gln
Phe Ala Pro His Val Leu Tyr Pro Arg Arg Arg Leu Ile Asn Gly Leu His Ser
Ser Pro Pro Thr Tyr Trp Ile His Asp Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Ile Ala
ACT TGC GGC CCA CAT GGT TTA TAC CAG AAG AGG CCT CCA ACG AAG GGT CTA CCS
1629      1638      1647      1656      1665      1674
TGA XGG CCG GGT GTA CCA AAT ATC GTC TTC TCG CGA CGA TGT TTC CAA GAT GGC
*** Arg Arg Gly Val Pro Asn Met Val Phe Ser Gly Gly Cys Phe Gln Asp Gly
Glu Gly Gly Val Tyr Gln Ile Trp Ser Ser Pro Gln Asp Val Ser Lys Met Ala
Lys Ala Gly Cys Thr Cys Tyr Gly Leu Leu Arg Arg Met Phe Pro Arg Trp Leu

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

Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ser Tyr Tyr
Phe His Phe Phe His Ala Ala Thr Thr Asn
Phe Thr Phe Ser Thr Arg Gln Gln Leu Ile
TTT TCA CTT TCT TCA CCG GAC GAC ATC ATA A 5'
1737      1746      1755
AAA AGT GAA AGA AGT GCG CTG CTC TAC TAT 3'
Lys Ser Gly Arg Ser Ala Leu Leu *** Tyr
Lys Val Lys Gly Val Arg Cys Cys Ser Ile
Lys *** Lys Lys Cys Ala Ala Val Val

```

FIGURA 2 (cont. 6)

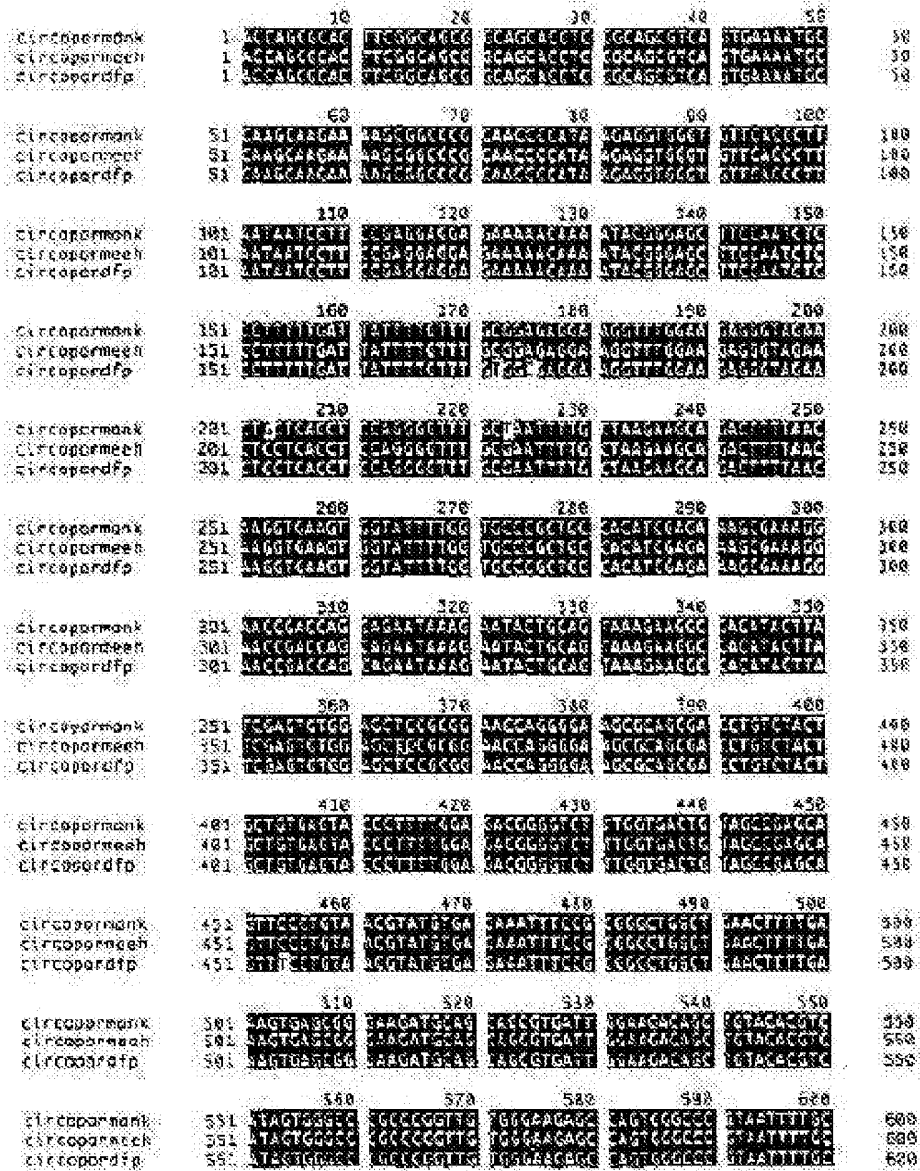


FIGURA 3

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

FIGURA 3 (cont. 1)

		1210	1220	1230	1240	1250	
circoparmank	1201	CCGATCGAT	CGTTTCTCC	CCGATCGAT	CGGGGTGAA	ATACCTGAG	1250
circoparmeek	1201	CCGATCGAT	CGTTTCTCC	CCGATCGAT	CGGGGTGAA	ATACCTGAG	1250
circopardfp	1201	CCGATCGAT	CGTTTCTCC	CCGATCGAT	CGGGGTGAA	ATACCTGAG	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
circoparmank	1251	CGTAACTAA	CGGCTGCGC	ATGCTGCTG	CGGCTGCGC	CGTAACTAA	1300
circoparmeek	1251	CGTAACTAA	CGGCTGCGC	ATGCTGCTG	CGGCTGCGC	CGTAACTAA	1300
circopardfp	1251	CGTAACTAA	CGGCTGCGC	ATGCTGCTG	CGGCTGCGC	CGTAACTAA	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
circoparmank	1301	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1350
circoparmeek	1301	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1350
circopardfp	1301	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
circoparmank	1351	AACCAACCT	CGACCAACA	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1400
circoparmeek	1351	AACCAACCT	CGACCAACA	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1400
circopardfp	1351	AACCAACCT	CGACCAACA	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
circoparmank	1401	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1450
circoparmeek	1401	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1450
circopardfp	1401	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
circoparmank	1451	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1500
circoparmeek	1451	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1500
circopardfp	1451	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
circoparmank	1501	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1550
circoparmeek	1501	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1550
circopardfp	1501	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
circoparmank	1551	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1600
circoparmeek	1551	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1600
circopardfp	1551	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
circoparmank	1601	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1650
circoparmeek	1601	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1650
circopardfp	1601	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	
circoparmank	1651	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1700
circoparmeek	1651	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1700
circopardfp	1651	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
circoparmank	1701	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1750
circoparmeek	1701	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1750
circopardfp	1701	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
circoparmank	1751	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1800
circoparmeek	1751	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1800
circopardfp	1751	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	CGGCTGCTG	1800

FIGURA 3 (cont. 2)

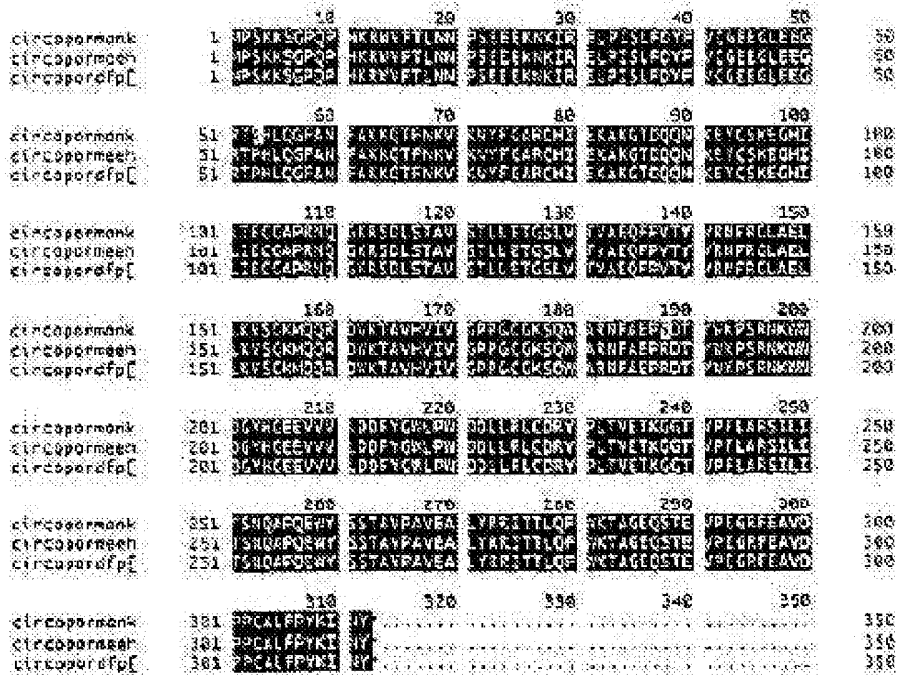


FIGURA 4

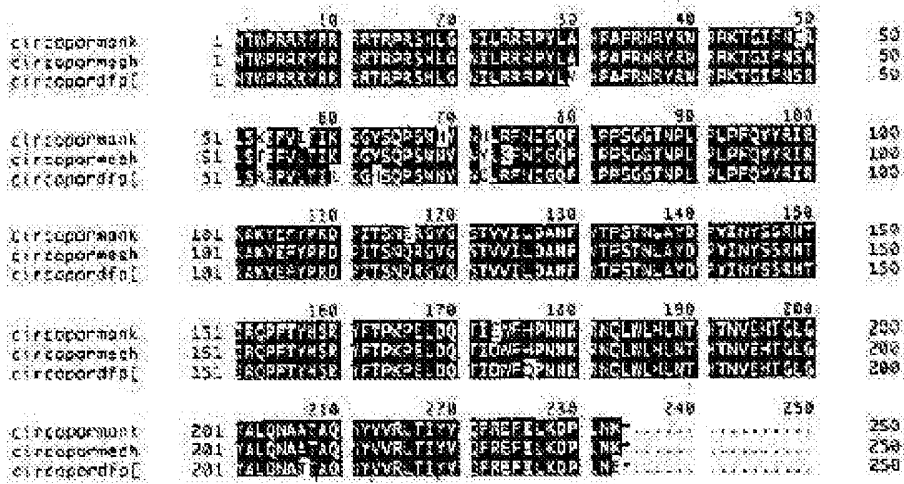


FIGURA 5

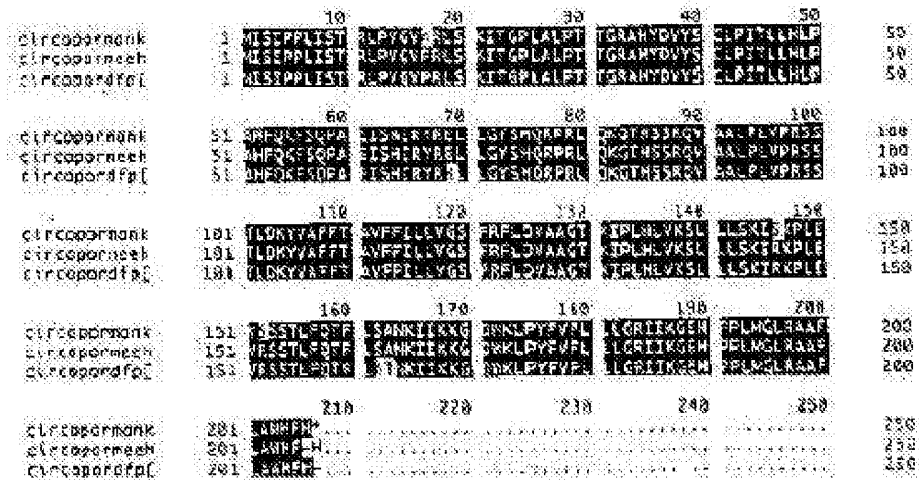


FIGURA 6

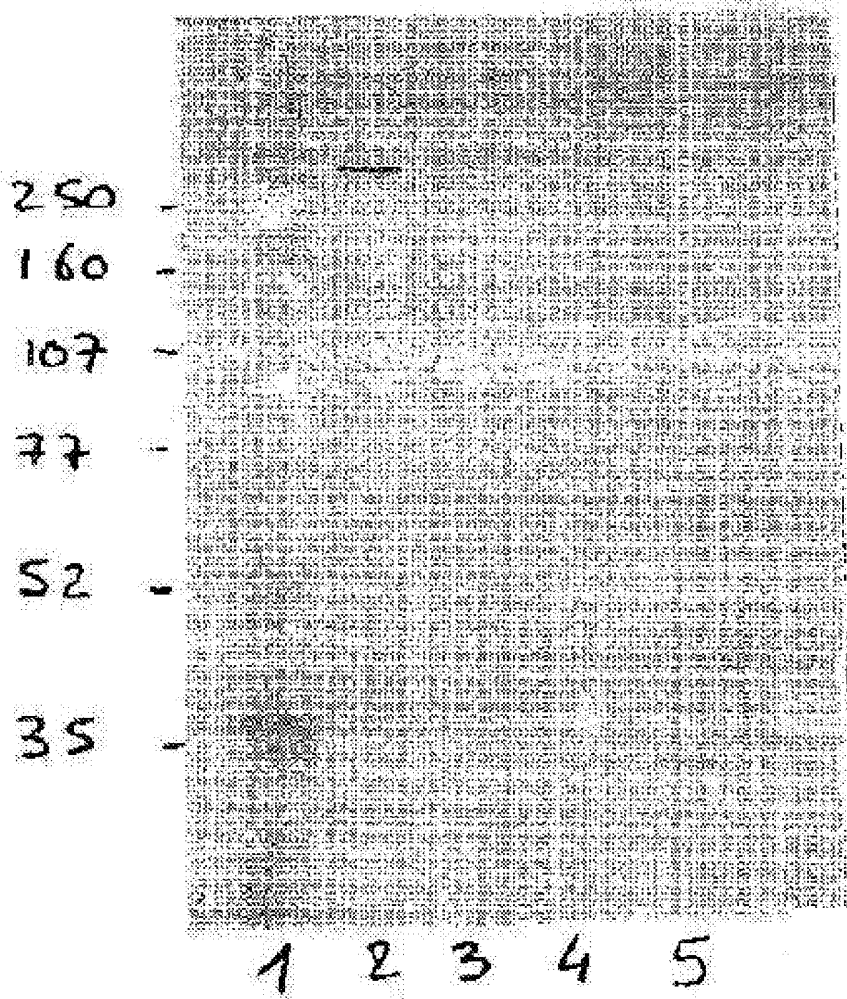


FIGURA 7

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

FIGURA 8

Pro Ile Gln Thr Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Cys Ile Leu Leu
 His Tyr Lys Pro Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser *** Cys
 Thr Thr Asn Pro His Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Leu Asp Ala
 TCA CCA TAA ACC CAC GCG CGA CCG TGT AGC TCT TTC GCT TTC CTT GTC TAG TCG
 279 288 297 306 315 324
 ACT GCT ATT TGT GTC CCG GGT GCG ACG TCG ACA AAG CGA AAG GAA CAG ATC ACC
 Ser Gly Ile Trp Val Phe Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Gln Ile Ser
 Val Val Phe Gly Cys Phe Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Ser Ala
 Arg Tyr Leu Gly Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln

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

Ser Arg Leu Ser Leu Pro Thr Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Gln Gln Leu
 Leu Asp *** Pro Cys Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Lys Asn Ser
 *** Ile Glu Pro Val Val Ser His Gly Thr *** Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro
 GAT CTA CAG TCC CTS TTS CCG CAC TGG ACA GAC GAC GAC ACT CAT CGA ACA ACC
 387 396 405 414 423 432
 CTA GAT CTC ACG GAC AAC GGA GTG ACC TGT CTA CTG CTG TCA GTA GCT TGT TGG
 Leu Asp Leu Arg Asp Asn Gly Val Thr Cys Leu Leu Leu *** Val Phe Cys Trp
 *** His Ser Gly Thr Thr Glu *** Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Leu Val Gly
 Ser Ser Gln Gly Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Gln

Ala Pro Thr Gln His Gly Asn Cys Leu Leu Val Arg Tyr Arg Lys Asp Ser Ile
 Leu Pro Leu Arg Thr Val Thr Ala Ser Cys Cys Gly Thr Val Asn Thr Leu Phe
 Ser Arg Ser Asp Pro Ser Arg Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Thr Gln *** Phe
 TCT GGC CCG GAG ACC ACT GGC AAC CTC TCG TCG TCG GAC ATT CGA AAC AGT CTT
 441 450 459 468 477 486
 AGA GCG GGA GTC TCG TGA CCG TGG CAG AGC ACC ACC CTC TAA CTT TCG TGA GAA
 Arg Ala Gly Val Trp *** Pro Leu Gln Ser Ser Thr Leu *** Arg Leu Ser Glu
 Glu Arg Glu Ser Gly Asp Arg Cys Arg Ala Ala Pro Cys Asn Val Cys Gln Lys
 Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val Arg Asn

Glu Ala Pro Gln Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Phe His Leu Leu Thr Ile
 Lys Arg Pro Ser Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Phe Arg Ser
 Asn Gly Arg Ala Pro Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Phe Ala Ser Ala His
 TAA ACC CCG CCG ACC GAC TTC AAA ACT TTC ACT GGC CCG TTT ACG TCT TCG CAC
 495 504 513 522 531 540
 APT TCG GCG GCG TCG CTG AAC TTT TGA ARG TGA GCG GGA AAA TCG AGA ACC GTC
 Ile Ser Ala Gly Trp Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Gly Lys Cys Arg Ser Val
 Phe Pro Arg Ala Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asn Ala Glu Ala ***
 Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Lys Arg Asp

FIGURA 8 (cont. 1)

Pro Leu Ser Ile Tyr Val Asp Asn His Pro Trp Arg Pro Thr Thr Phe Ala Phe
 Gln Phe Val Leu Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro His Pro Leu Leu Leu
 Asn Ser Ser *** His Val Arg *** Gln Pro Ala Val Gln Thr His Tyr Phe Cys
 TAA CTT TCT GGT TAC ATG TGC AGT AAC ACC CCG GTC GAC CCA CAC CAT TTT CGT
 542 558 577 576 585 584
 ATT GGA ACA CTA ATG TAC ACG TCA TCG TCG CGC CAC CTG CGT GTC CTA AAA CCA
 Ile Gly Arg Leu Met Tyr Thr Ser Leu Trp Gly His Leu Gly Val Val Lys Ala
 Leu Gln Asp *** Cys Thr Arg His Cys Gly Ala Thr Trp Val Trp *** Lys Gln
 Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Trp Gly Cys Gly Lys Ser Lys

Pro Ser Ser Ile Lys Cys Val Arg Phe Gly Cys Val Pro Phe Trp Arg Ser Val
 His Ala Ala Leu Lys Ala Ser Gly Ser Val Val Tyr Gln Phe Gly Gly Leu Phe
 Ile Pro Gln *** Asn Gln Leu Gly Pro Phe Trp Met Ser Ser Val Val *** Phe
 CTA CCG CAC CAT TAA AAC CTC TCG CCC TTT CTT CTA TCA CCT TTC CCG GAT CTT
 601 612 621 630 639 648
 AAT CGG CTG CTA ATT TTC CAG ACC CCG AAA CCA CAT ACT GGA AAC CAC CTA GAA
 Asn Gly Leu Leu Ile Leu Gln Thr Arg Lys Pro His Thr Gly Asn His Leu Gln
 Met Gly Cys *** Phe Cys Arg Pro Gly Asn His Ile Leu Gln Thr Thr *** Lys
 Trp Ala Ala Asn Pro Ala Asp Pro Gln Thr Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn

Leu Pro Pro Ile Thr Val Met Thr Thr Phe His Asn Asn Asn Ile Val Lys Ile
 Leu His His Ser Pro *** Trp Pro Ser Ser Thr Thr Thr Ile Ser Ser Lys ***
 Cys Thr Thr Pro His Asn Gly His His Leu Leu Pro Gln *** Gln His Ser Lys
 TGT TCA CCA CTT TAC CAA TCG TAC CAC TTC TTC ACC AAC AAT AAC TAC TCA AAA
 657 666 675 684 693 702
 ACA AAT GGT GCG ATG GAT ACC ATG CAG AAC AAG TCG TTC TTA TTC AAG ACT TTT
 Thr Ser Gly Gly Met Val Thr Met Val Lys Lys Trp Leu Leu Leu Met Thr Phe
 Gln Val Val Gly Trp Leu Pro Trp *** Arg Ser Gly Cys Tyr *** *** Leu Leu
 Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Gln Gln Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr

Ala Pro Gln Gly Pro Ile Ile *** Gln Ser Gln Thr Ile Ser Ile Trp Gln Ser
 Pro Gln Ser Gly Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val
 His Ser Ala Ala Arg Pro His Asp Val Ser Val Thr His Asp Ile Asp Met Ser
 TAC CCA CCG ACC GGA CCG TAC TAG ATC ACT CTG ACA CAG TAG CTA TAG GTA ACT
 711 720 730 738 747 756
 ATG CCT GCG ACC CCT GCG ATC ATC TAC TGA GAC TGT CTC ATC CAT ACC CAT TCA
 Met Ala Gly Cys Pro Gly Met Ile Tyr *** Asp Cys Val Ile Asp Ile His ***
 Trp Leu Ala Ala Leu Gly *** Ser Thr Gln Thr Val *** Ser Ile Ser Ile Asp
 Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr

Tyr Leu Ser Phe Thr Ser Ser Tyr Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly
 Thr Ser Val Leu Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Arg Ile Val
 Gln Leu Ser *** Leu His Phe Gln Val Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Gln Ser ***
 CAC ATC TCT GAT TTC CAC CTT CAC ATG CAA ACA ACC GCG COT CAT AAG ACT AAT
 765 774 783 792 801 810
 CTG TAG AGA CTA AAG GTG GAA CTA TAC CTT TTT TCG CCC GCA GTA TTC TGA TTA
 Leu *** Arg Leu Lys Val Glu Leu Tyr Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu
 Cys Arg Asp *** Arg Trp Asn Cys Thr Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Ser Asp Tyr
 Val Gln Thr Lys Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr

FIGURA 8 (cont. 2)

Ala Ile Leu Gly Arg Gln Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe
 Leu Leu *** Val Gly Asn Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser
 Trp Cys Asp Ser Gly Thr Pro Ile Thr Ser Arg Leu Glu Gln Gly Leu Glu Leu

 GGT COT TCG TCT GCG ACC TTA CCA TGA GGA GPT GAC GGC AGC GTC GAC ATC
 819 828 837 846 855 864
 GCR GCA AUC AGA CCC CCG TCG AAT GGT ACT CCG CAA CTC CTC CCC CAC CTC TAG

 Pro Ala Ile Arg Pro Arg Trp Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu ***
 Gln Glu Ser Asp Pro Val Gly Met Val Leu Leu Ser Cys Cys Pro Ser Tyr Arg
 Ser Asn Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu

Ser Lys Ile Pro Pro Asn Ser Gly Gln Tyr Lys Pro Leu Ile Ser Cys Phe Leu
 Ala Arg *** Arg Leu Ile Val Glu Lys Thr Asn Gln Phe Phe Ala Val Ser Cys
 Leu Glu Lys Asp Ser Ser *** Lys Arg Pro Ile Lys Ser Ser His *** Leu Val

 TTC GAG AAA TAG CCG CCG AAT GAA GCA ACC ATA AAA CCG TCG TAG GAT CTC TTC
 871 882 891 900 909 918
 AAC CTC TTT ATC GGA GGA TTA CTT CCG TCG TAT TTT GCA AGA ATG CTA CAG AAC

 Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Leu Pro Trp Tyr Phe Gly Arg Met Leu Gln Asn
 Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Phe Leu Gly Ile Leu Glu Glu Cys Tyr Arg Thr
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr Glu Gln

Gly Arg Leu Phe Pro Ala Leu Glu Asp Gly Lys Gly Gly Trp Ala Arg Phe Lys
 Asp Val Ser Ser Pro Pro Trp Asn Thr Val Arg Glu Gly Gly His Gly Ser Asn
 Ile Trp Pro Pro Leu Pro Gly Thr Arg *** Gly Lys Gly Gly Met Gly Glu Ile

 TTA COT CCG TCC TTC CCC GCG TCA ACG ACG GCG AAA CCG GCG GGA CCG GAC TTA
 927 936 945 954 963 972
 AAT GCA CCG AGG AAG GGG GCG ACT TCG TCA CCG TTT CCG CCG CAT CCG CTC AAT

 Asn Pro Arg Arg Lys Gly Ala Ser Ser Ser Pro Phe Pro Pro His Ala Leu Asn
 Ile His Gly Gly Arg Gly Pro Val Arg His Pro His Pro Pro Pro Pro *** Ile
 Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro Cys Pro Glu Phe

Trp Ile Phe Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asp Ser Arg Leu Pro Lys *** ***
 Gly Tyr Ser Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Ile Val Glu Tyr His Asn Lys Asn
 Glu Met His Phe Leu Asn Ser Leu Arg Lys *** *** Lys Thr Ile Thr Lys Ile

 AAC CTA TAC TTT ATC TAA TCA CTC ACA AAA AAT ACT GAA CCA TTA CCA AAA ATA
 981 990 999 1008 1017 1026
 TTC CAT ATG AAA TAA ATT ACT GAC TCT TTT TTA TCA CTT CCG AAT CGT TTT TAT

 Phe His Met Lys *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Ser Leu Arg Asn Gly Phe Tyr
 Ser Ile *** Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Tyr His Phe Val Met Val Phe Ile
 Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Leu

Glu Asn Leu Thr Leu His Pro Thr Lys Leu Ile Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met
 Asn Met Leu Pro *** Thr Pro Pro Arg *** Phe *** Ile Arg Gln Ile Phe Cys
 Ile *** *** Pro Asn Leu Pro Pro Asp Lys Phe Asn Phe Glu Arg Phe Gln Val

 ATA AAT AAT TCC CAA TTC ACC CCG CAG AAA TTT TAA TTT AAG AGA CTT AAC ATG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 TAT TCA TTA ACG GTT AAG TCG GCG GTC TTT NAA ATT AAA TTC TCC GAA TTC TAG

 Tyr Ser Leu Arg Val Lys Trp Gly Val Phe Lys Ile Lys Phe Ser Glu Leu Tyr
 Ile His *** Gly Leu Ser Gly Gly Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Asn Cys Thr
 Phe Ile Lys Gly *** Val Gly Gly Leu *** Asn *** Ile Leu *** Ile Val His

FIGURA 8 (cont. 3)

Cys Pro *** Val Ser Ile Thr Asn Arg Thr Thr Tyr Val Thr Lys Ser Arg Leu
 Val His Asn Cys Pro Tyr Gln Ile Gly Pro Arg Ile Tyr Gln Lys Arg Val Cys
 Tyr Met Thr Val Arg Ile Asn Tyr Glu Gln Asp Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Ala

 CAG GTA CCA ATG TGC CTA TAA CAT AAG GAC CAG CAT ATA TCA CAA AAG CTT GCG
 1089 1098 1107 1116 1125 1134
 ADA CAT GGT TAC ACG GAT AIT GTA TCC CCG CTC GAA TAT ACT GGT TTC GAA CGC

 Ile His Gly Tyr Thr Asp Ile Val Phe Leu Val Val Tyr Thr Val Phe Glu Arg
 Tyr Met Val Thr Arg Ile Leu Tyr Ser Trp Ser Tyr Ile Leu Phe Ser Asn Ala
 Thr Trp Leu His Gly Tyr Cys Ile Pro Gly Arg Ile Tyr Cys Phe Arg Thr Gln

 Ala Ser Ala *** Thr Thr *** His Glu Leu Leu Lys Tyr Asp *** Gly Cys Ser
 His Arg Pro Arg Arg Pro Arg Cys Lys Trp Cys Asn Thr Thr Glu Ala Val Ala
 Thr Gly Leu Gly Val His Asp Val Asn Gly Ala Thr Gln Leu Arg Leu Trp Leu

 TCA CCG CTC CCG ATG CAC CAG ATG TAA ACG TGG TCA AAG ACC AGA GTC CCG CTC
 1143 1152 1161 1170 1179 1188
 AGT CCG GAG CCG TAC CTC CTC TAC ATG TCC ACC AGT TGG PGG TGT CAG CCA CAG

 Ser Ala Glu Ala Tyr Val Val Tyr Ile Ser Ser Ser Leu *** Ser Gln Pro Gln
 Val Pro Arg Pro Thr Trp Ser Thr Phe Pro Ala Val Cys Ser Leu Ser His Ser
 Cys Arg Gly Leu Arg Gly Leu His Phe Glu Gln Phe Val Val Ser Ala Thr Ala

 Thr Glu Cys Thr Thr Gln Asn Ser Thr Phe Leu Leu Ser Ile *** Ser Leu Asn
 Pro Lys Lys Gln Gln Lys Thr Pro Leu Leu *** Tyr His Phe Arg Pro Cys Thr
 Gln Asn Arg Lys Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Asp Ile Thr Phe Asp Leu Val Pro

 GAC GAA ACA AAA CAA CAA ACC AAC CTT CAT TAC TTA TCA CTT TAC ATC CTC TCC
 1197 1206 1215 1224 1233 1242
 CTG GGT TCT TTT GTT GTT TCG TTT GAA GGA ATC AAT AGT GAA ATC TAG GAC ACG

 Leu Val Ser Phe Val Val Trp Leu Glu Val Ile Asn Ser Glu Ile *** Asp Arg
 Trp Phe Leu Leu Leu Phe Gly Trp Lys *** Ser Ile Val Lys Ser Arg Thr Gly
 Gly Phe Phe Cys Cys Leu Val Gly Ser Asn Gln *** *** Asn Leu Gly Gln Val

 Pro Pro Leu Thr Gly Pro Thr Thr Pro Ser Pro Ser Pro *** Pro Ile Ala Pro
 Gln Pro Tyr Leu Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu Ala Pro Asn His Tyr Pro Pro
 Lys Pro Thr Phe Tyr Arg Ser His Tyr Ser Phe Pro Gln Thr Ile Thr His Arg

 AAA CCG CCA TTT CAT GCG CTT CAC CAT CTT CTT CCG GAC CCA ATA CCA TAC CCG
 1251 1260 1269 1278 1287 1296
 TTT GCG GGT AAA GTA CCG GGA CTT GTA CCA GAA CCG CTC GGT TAT GGT ATC CCG

 Phe Gly Gly Lys Val Pro Gly Val Val Gly Glu Gly Leu Gly Tyr Gly Met Ala
 Leu Gly Val Lys Tyr Arg Glu Trp *** Glu Lys Gly Trp Val Met Val Trp Arg
 Trp Gly *** Ser Thr Gly Ser Gly Arg Arg Arg Ala Gly Leu Trp Tyr Gly Gly

 Pro Thr Thr *** Met Pro Thr Met Pro Ser Pro Gln Pro Arg Gln *** Leu Thr
 Leu Leu Leu Lys Cys Leu Pro *** Leu His Pro Ser His Gly Lys Asn Cys Leu
 Ser Ser Tyr Asn Val Tyr Pro Asp Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Lys Thr Val Phe

 CTT CTT CAT CAA ATG TAT CCC CAG TAT TCA CTC CCG ACA CCG GAA ACA ATG TTT
 1305 1314 1323 1332 1341 1350
 GGA GGA GGA GTT TAC ATA GCG CTC ATA GGT GAG GCG TGT CCG CTT TGT TAC AAA

 Gly Gly Val Val Tyr Ile Gly Val Ile Gly Glu Gly Cys Gly Leu Cys Tyr Lys
 Gln Gln *** Phe Thr *** Gly Ser *** Val Arg Ala Val Ala Phe Val Thr Lys
 Arg Ser Ser Leu His Arg Gly His Arg *** Gly Leu Trp Pro Leu Leu Gln Ser

FIGURA 8 (cont. 4)

Ile Met *** Phe Leu Leu Val Pro Ala Trp Glu Gly Thr Val Arg Pro Ser Arg
 *** Arg Phe Tyr Cys Cys Gln Leu Gly Ser Gly Gln *** Gly Pro His Asp
 Asn Asp Asp Leu Ile Val Ala Ser Ser Gly Val Gly Arg Asp Gly Gln Thr Ile
 CAA CAC CAG AAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA
 1352 1353 1377 1386 1395 1404
 GGT ATC ATC TAA AAT AAC AGC ACT GGA GCG CAC TCC CCG CTC ACC CTG CCG GAT
 Val Ile Phe *** Asn Asn Ser Thr Gly Ala His Ser Pro Val Thr Leu Gly Asp
 Leu Ser Ser Lys Ile Thr Ala Leu Glu Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Val Ile
 TTT HIS LEU LYS *** GLN HIS TRP SER TRP LEU TRP CYS HIS TRP GLY *** SER

Pro Ala Pro Gly Ser Asn Leu Arg Leu Arg Glu *** Glu Thr Thr Asn Leu Pro
 Pro Leu Ala Leu Ile *** Gly *** Gly Lys Lys Asn Gln Leu Ile *** Leu
 Pro Ser Cys Pro Trp Phe Glu Val Lys Val Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Glu Phe
 GCG CCT CGT CCC GGT CTT AAG TTG GAA TTG GAA AGA ATA ACA CAT CAT AAC TTT
 1411 1422 1431 1440 1449 1458
 CGC CGA CCA GGC CCA GAA TTC AAC CTT ABC CTT TCT TAT TCT GTA GTA TTT AAA
 Arg Gly Ala Gly Pro Glu Phe Asn Leu Asn Leu Ser Tyr Ser Val Val Pro Lys
 Gly Glu Gln Gly Gln Asn Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Leu *** Tyr Ser Lys
 Gly Ser Arg Ala Arg Ile Gln Pro *** Pro Phe Leu Phe Cys Ser Ile Gln Arg

Cys Leu Ala Pro Thr Gln Gly Gly Glu Gln Pro His Phe Thr Met Leu Ile Ser
 Ala Cys Leu Pro Phe Lys Val Gly Arg Arg Pro Ser Ser Leu *** Tyr Gln
 Pro Val Ser Arg Pro Asn Ser Gly Gly Gly Pro Pro Leu Phe Asp Asn Ile Asn
 GCG GTC TCT CCG CCC CAA AAT GGG AGG AGC GCG TTC TTT CAG TAA TTA TAA
 1467 1476 1485 1494 1503 1512
 GCG CAC AGA GCG GCG GGT TGA CCC CCC TCC TCC GCG AAC AAA CTC ATT AAT ATT
 Gly His Arg Ala Gly Val *** Pro Pro Ser Trp Gly Lys Lys Val Ile Asn Ile
 Gly Thr Glu Arg Gly Phe Asp Pro Pro Pro Gly Gly Arg Lys Ser Leu Ile Leu
 Ala Gln Ser Gly Gly Leu Thr Pro Leu Leu Gly Glu Glu Ser His *** Tyr ***

Asp *** Thr Trp Arg Gly Pro Pro Arg Glu Ser Gln Pro Glu Ser Ser Leu
 Ile Glu Asp His Gly Gly Gly Leu Leu Ala Asn Gln Ser His Asn Ala Gln Cys
 Phe Arg Met Met Asp Val Ala Trp Ser Pro Thr Arg Val Thr Thr Arg Lys Val
 CTT ACA CTA CAG CTC GCG GGT CCG CCC GCA ACA CTC ACA CCA ACC CAA CCG
 1521 1530 1539 1548 1557 1566
 GAA TCT CAT CAT GTC CAC GCG GCA GGA GCG CCG TCT GAC TGT GGT TCG CTT GAC

Glu Ser His His Val His Arg Pro Gly Gly Arg Ser Asp Cys Gly Ser Leu Asp
 Asn Leu Ile Met Ser Thr Ala Gln Gln Gly Val Leu Thr Val Val Arg Leu Thr
 Ile Ser Ser Cys Pro Pro Pro Arg Arg Ala Phe *** Leu Trp Phe Ala *** Gln

Ile Asp Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ala Met Lys Gly Glu Gly
 Tyr Ile Arg Leu His Pro Leu Pro Pro His Gln Leu His Trp Lys Glu Lys Glu
 Thr Tyr Gly Phe Thr Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Ile Gly Asn Lys Arg Arg
 TCA TAT AGG CTT CCA CCG CCG CCG CCA CAA CTT CTA CCG TAA AAA CCA ACA
 1575 1584 1593 1601 1611 1620
 AAT ATA TCG GAA CCG GCG GCA CAG GCG GGT GTT GAA GAT GCG AAT TTT CCG TCT
 Ser Ile Ser Glu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Val Gln Asp Ala Ile Phe Pro Ser
 Val Tyr Pro Lys Val Arg Glu Arg Arg Val Leu Lys Met Phe Phe Leu Leu
 Tyr Ile Arg Arg Cys Gly Arg Gly Gly Cys *** Arg Cys His Phe Ser Phe Ser

FIGURA 8 (cont. 5)

Ala Thr Val Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gly Pro Ala Ala Ala Ser Ser Arg Ala
 Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Pro Pro Pro Pro Asp Pro
 Trp Arg Tyr Arg His Arg Pro His Val Leu Trp Pro Arg Arg Arg Leu Ile Glu
 GCT GCG CAG TGG CAC GCG GCG GAC CCG CTC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG
 1629 1638 1647 1656 1655 1674
 CCA GCG GTA ACG GTC GCG GCG GTC GAC GAG GCA GGG GCG GCG GCG GCG GAT CTA
 Pro Ala Val Thr Val Ala Gly Val Asp Glu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Asp Leu
 Glu Arg *** Arg Trp Arg Gly Trp Thr Ser Glu Gly Arg Arg Arg Arg Ile Trp
 Ser Gly Asp Gly Gly Gly Gly Gly Arg Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 Leu Ile Ala Ala Pro Ala Thr Asp Glu Glu Glu Thr Val Gly Gly Glu Ile Arg
 Trp Ser Pro Glu Pro Pro Pro Thr Lys Lys Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ser Val
 Gly Leu His Ser Arg Pro Arg His Arg Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Tyr
 GCG TTC TAC CCA GCG GCG GCG GAC AGA AGA AGA AOC CAT TCC GGA GGA ACC TAT
 1681 1692 1701 1710 1719 1728
 GCG AAG ARG GCT GCG GCG GCG GTC GCT GCT GCT TCC GTA ACC GCT GCT TCC ATA
 Ala Lys Met Ala Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Pro Pro Trp Ile
 Pro Arg Trp Leu Arg Gly Arg Cys Leu Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly Tyr
 Glu Asp Gly Cys Gly Gly Gly Val Phe Phe Phe Gly Asn Ala Ser Leu Asp Thr
 *** Ile Glu Phe Arg Phe Phe His Ala Thr Leu Ile
 Asp Tyr Arg Phe Val Phe Ser Thr Arg Glu Leu Tyr
 Thr Met Asp Ser Phe Ser Leu Leu Ala Ser Tyr Thr Asn
 GCA GTA TAC ACT TTT GCT TTC TTC ACC GCA CAT TCA TTA S
 1737 1745 1755 1764
 GTT CAT TTC TGA AAA GCA AAC AAC TCC GCT CTA ACT ATT J
 Arg His Ile *** Lys Arg Lys Lys Cys Ala Val Ser Ile
 Val Ile Ser Glu Asn Glu Arg Ser Ala Leu *** Val
 Ser Tyr Leu Lys Thr Lys Glu Val Arg Cys Lys Tyr

FIGURA 8 (cont. 6)

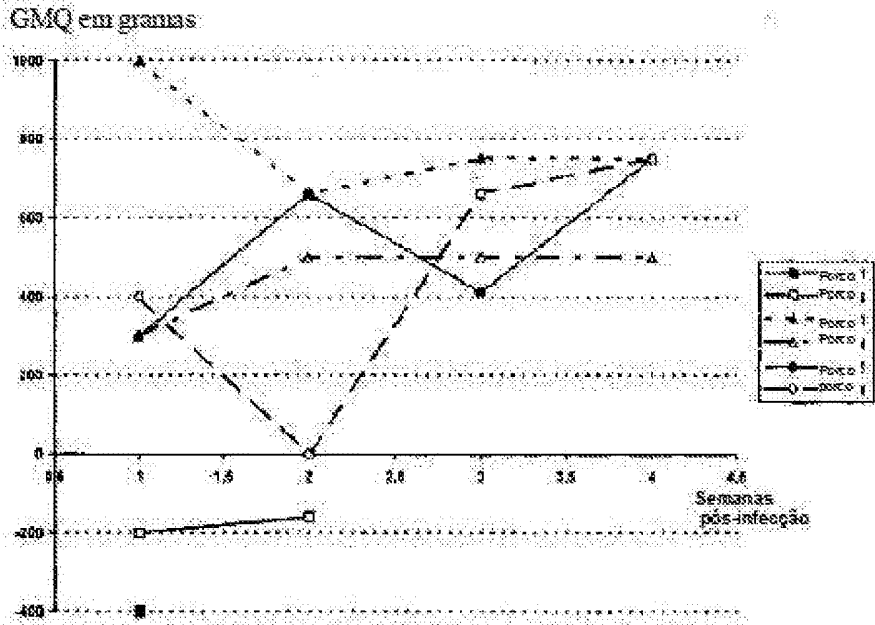


FIGURA 9

"gmq : d0 - d28"

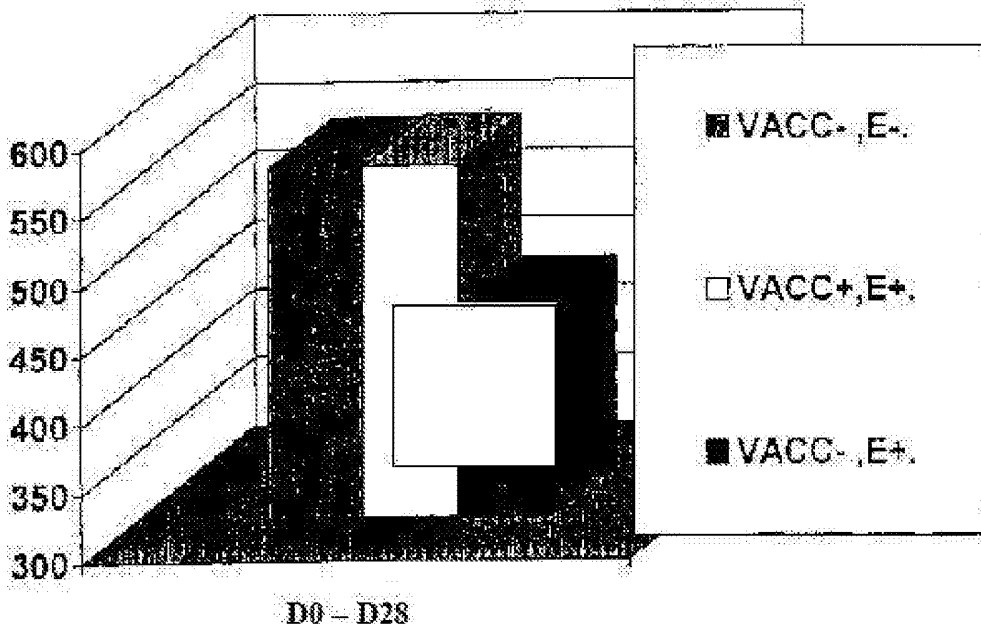


FIGURA 10

% HIPERTERMIAS > 41 °C

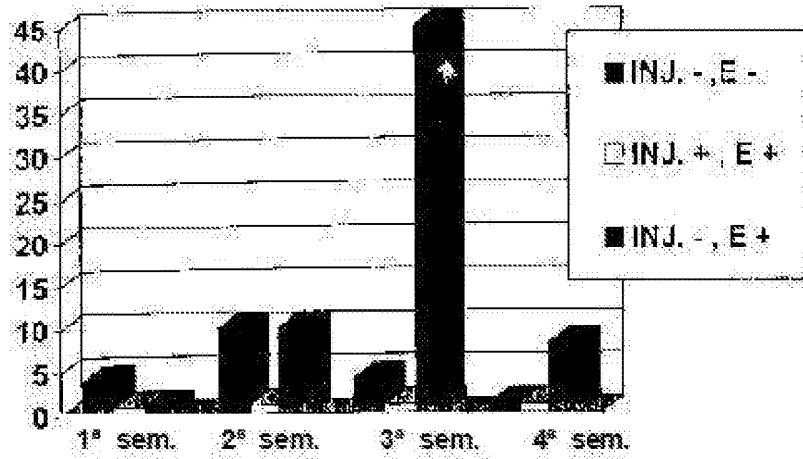


FIGURA 11

1 50 21
DQVA MTKAKKSLRY KRREEDLIG NGLIDRCSLY HQAI-KRY99 DKKKGLRMR TCRFRFCTI RNTIRDFSM
DQVR MZLPPQVYR ARRTKSSAG QLLSRFELY EP RRRSR RRRKQENTR TCRQRYTYK RTRKQDWA
peptdo 177 180 181 peptdo 188 a 189
DQVA VAPLRFVGGI TFRGGIRI TPGTQYLR RIRKREKAP QITSGEYR GDSYVIMN TQ RSDYR
DQVR VIKQNSFRI IL RQDQSR RGRFRYAT RRYTUSWPC SPITQDDEY GDSVILLIS T RYATAPY
peptdo 121 peptdo 132 a 133
150 151 _____ peptdo 208
DQVA DQYTKSEH YIRQVETDS DLYRREDO QYSGTQNN RIRKQVMTA TSHYVSTGL GYLQVATK
DQVR DQYKQSDRI QITSGEYR RYRPRVLD ELLDTFGNN RIRKLVMTQ TSHYVSTGL GYRQVNSYR
peptdo 152
150
DQVA GRYVVALTS VQVRFELYS TQNS
DQVR QSYRISLTP VQVRFENKA TQNS

FIGURA 13

Tipo B
"spot n°104 a 150"

Tipo A
"spot n°150 a 215"

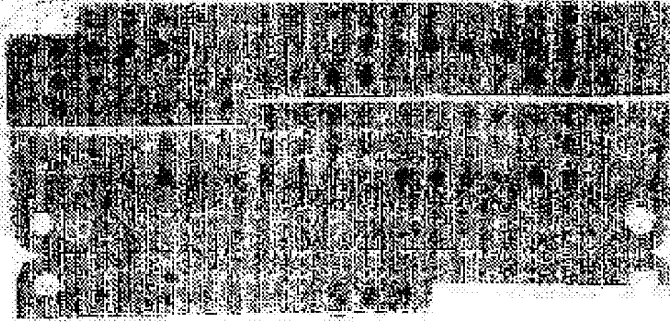


FIGURA 12