

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

(22) Data de pedido: 2000.07.13	(73) Titular(es): MERIAL	
(30) Prioridade(s):	17, RUE BOURGELAT 69002 LYON	FR
(43) Data de publicação do pedido: 2002.08.07	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.04.11 083/2008	JEAN-CHRISTOPHE FRANCIS AUDONNET	FR
	PHILIPPE GUY NICOLAS BAUDU	FR
	SYLVIE CLAUDINE BRUNET	FR
	(74) Mandatário:	
	ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **GENES DE CALICIVÍRUS FELINO E VACINAS NOMEADAMENTE VACINAS RECOMBINADAS**

(57) Resumo:

RESUMO

**"GENES DE CALICIVÍRUS FELINO E VACINAS NOMEADAMENTE VACINAS
RECOMBINADAS"**

A invenção refere-se à sequência do gene da cápside e uma sequência de ADNc correspondente, de uma estirpe de FCV dominante, denominada FCV 431. Refere-se também à sequência do gene da cápside assim como à sequência do ADNc de uma estirpe complementar denominada GH-1. As sequências de ADNc podem ser incorporadas nos vectores de expressão para preparar formulações imunogénicas e vacinas recombinadas ou subunidades que permitem a vacinação contra a calcivirose felina.

DESCRIÇÃO**"GENES DE CALICIVÍRUS FELINO E VACINAS NOMEADAMENTE VACINAS RECOMBINADAS"**

A presente invenção refere-se a genes de estirpes particulares de calicivírus felinos, às proteínas codificadas por estes genes, e sua utilização para a realização de preparações imunogénicas e de vacinas recombinantes ou de subunidades contra a calicivirose felina. Estas preparações imunogénicas e estas vacinas podem igualmente ser combinadas com preparações imunogénicas ou vacinas preparadas com base em outros agentes patogénicos felinos, para a realização de preparações imunogénicas e de vacinas multivalentes.

Os calicivírus felinos (em inglês Feline Calicivirus ou FCV) foram descritos pela primeira vez em 1957 (Fastier L.B. *Am. J. Vet. Res.* 1957. 18. 382-389). Os calicivírus felinos são com os vírus do herpes felinos as duas fontes principais das afecções virais do tracto respiratório superior no gato. Os vírus FCV afectam um grande número de animais, com taxas de portador de FCV da ordem de 15 a 25%, e uma seroprevalência anti-FCV de 70 a 100% (Coutts *et al.* *Vet. Rec.* 1994. 135. 555-556; Ellis T.M. *Australian Vet. J.* 1981. 57. 115-118; Harbour *et al.* *Vet. Rec.* 1991. 128. 77-80; Reubel *et al.* *Feline Dentistry*

1992. 22. 1347-1360). Depois de uma fase inicial de hipertermia, estas afecções respiratórias são geralmente acompanhadas de ulcerações bucais (palato, língua, lábios, nariz), de rinite, de conjuntivite, eventualmente de anorexia e de astenia. Os vírus FCV podem igualmente causar pneumonias, enterites, e dores articulares (síndrome de coxeio).

A transmissão do vírus FCV só se faz horizontalmente, não há transmissão vertical da mãe à sua cria durante a gestação (Johnson R.P. *Res. Vet. Sci.* 1984. 31. 114-119). A transmissão do FCV faz-se através do contacto entre os animais infectados e animais sãos ou por via aérea durante o ressono (Wardley RC. *Arch. Virol.* 1976. 52. 243-249).

Os calicivírus felinos são vírus nus da família dos *Caliciviridae*, eles são constituídos por um ARN positivo de cadeia simples, com um tamanho de cerca de 7,7 quilopares de bases (kpb) (Carter M.J. *Arch. Virol.* 1994. 9. 429-439).

Como em numerosos vírus de ARN, existe uma grande heterogeneidade no seio da população viral de FCV. As variações antigénicas, colocadas em evidência no início dos anos 70 por experiências de seroneutralizações cruzadas, permitem classificar os FCV em várias estirpes virais ou quasi-espécies (Radfoord *et al. Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses* ESVV 1997. 93-99).

Foram isoladas várias estirpes de FCV e sequenciadas, nomeadamente a estirpe F9 (Carter *et al.* *Arch. Virol.* 1992. 122. 223-235, sequência depositada no banco de dados GenBank sob o número de acesso M86379), CFI (Neill *et al.* *J. Virol.* 1991. 65. 5440-5447, número de acesso GenBank U13992 e M32819), Urbana ou URB (Sosnovtsev e Green *Virology* 1995. 210. 383-390, número de acesso GenBank L40021), F4 (Tohya *et al.* *Arch. Virol.* 1991. 117. 173-181, números de acesso GenBank D31836 e D90357), KCD (Fastier L.B. *Am. J. Vet. Res.* 1957. 18. 882-889, número de acesso GenBank L09719), LLK (número de acesso GenBank U07131), NADC (número de acesso GenBank L09718), 2280 (número de acesso GenBank X99445) e 255 (Kahn e Gillepsie. *Cornell Vet.* 1970. 60. 669-683, número de acesso GenBank U07130).

A vacinação contra o FCV foi iniciada depois do fim dos anos 70 a partir de estirpes FCV atenuadas, principalmente a estirpe F9 isolada em 1958 por Bittle (Bittle *et al.* *Am. J. Vet. Res.* 1960. 21. 547-550) ou estirpes derivadas de F9 por passagem *in vitro* ou *in vivo* ("do tipo F9").

As vacinas inactivadas estão também disponíveis. Utilizam as estirpes 255 e 2280, isoladas respectivamente em 1970 num gato que apresentava uma pneumonia (Kahn e Gillepsie. *Cornell Vet.* 1970. 60. 669-683) e em 1983 num gato com coxeio (Pedersen *et al.* *Fel. Prac.* 1983. 13. 26-35).

A resposta humoral é essencialmente dirigida contra a proteína da cápside, também denominada p65 (Guiver *et al. J. Gen. Virol.* 1992. 73. 2429-2433). Os genes que codificam para a proteína de cápside de numerosos calicivírus felinos foram sequenciados e comparados sem que se pudesse distinguir mais particularmente certas sequências (Glenn *et al. Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses* ESVV 1997. 106-110 ; Geissler *et al. Virus Res.* 1997. 48. 193-206 ; Neill *et al. Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses* ESVV 1997. 120-124).

O gene que codifica para a proteína da cápside foi igualmente clonado e expresso em diferentes sistemas de expressão, nomeadamente o gene que codifica para a proteína da cápside do vírus FCV KS20 em plasmídeos (Geissler *et al. J. Virol.* 1999. 73. 834-838), Os genes que codificam as proteínas da cápside dos vírus FCV CFI-68, JOK63, JOK92, LS012 e F9 nos baculovírus (DeSilver *et al. Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses* ESVV 1997. 131-143), o gene que codifica a proteína da cápside do vírus FCV F4 nos vírus herpes felinos de tipo 1 (Yokoyama *et al. J. Vet. Med. Sci.* 1998. 60. 717-723). Estas diferentes construções permitiram a produção de proteínas da cápside recombinadas.

Devido à deriva antigénica ao longo dos tempos, os anti-soros produzidos contra estirpes vacinais antigas isoladas nos anos 60-70, tais como as estirpes F9, 255 ou 2280, apenas neutralizam poucos isolados dos anos 90. Por

exemplo, o soro anti-F9 neutraliza 43% dos isolados do período 1990-96, contra 56% para o período 1980-89 e 86% para o período 1958-79, e somente 10% dos isolados ingleses do período 1990-96 (Lauritzen *et al. Vet. Microbiol.* 1997. 56. 55-63).

A presente invenção tem como objectivo colocar em evidência estirpes de FCV, que induzem nos gatos anticorpos possuindo um largo espectro de neutralização cruzada.

A invenção tem, em particular por objectivo, a partir de estirpes seleccionadas, o isolamento e a caracterização, de genes que codificam para proteínas imunogénicas utilizáveis para a vacinação contra a calicivirose felina.

Um outro objectivo da invenção é o de propor vectores de expressão *in vitro* e *in vivo* recombinantes contendo e expressando, pelo menos, uma tal sequência nucleotídica.

Ainda um outro objectivo da invenção, é o de propor preparações imunogénicas ou vacinas contra a calicivirose felina.

Ainda um outro objectivo da invenção é o de propor preparações imunogénicas multivalentes e vacinas multivalentes contra a calicivirose felina e contra, pelo menos, um outro patogénico felino.

A invenção refere-se essencialmente a duas estirpes de FCV obtidas por zaragatoas faríngeas praticadas em França e no Reino Unido em gatos que apresentavam sinais de infecção por calicivírus felinos. Trata-se, respectivamente, da estirpe G1 (depositada na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (ou CNCM) do Instituto Pasteur, Paris, França, sob o número de acesso I-2167) e da estirpe 431 (depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166), ambas depositadas a 12 de Março de 1999. Esta estirpe FCV G1 isolada em França não corresponde à estirpe FCV isolada no Reino Unido em 1978 por Tohya (Tohya Y. *et al. Jpn. J. Sci.*, 1990, 52, 955-961) e igualmente denominada G1.

A selecção das estirpes FCV 431 e G1 foi realizada por testes de seroneutralização cruzada em comparação com isolados FCV de um painel de referência. Este painel de referência é composta por 18 isolados actuais de FCV recolhidos de gatos que apresentavam sinais de infecção por calicivírus felino e provêm de três zonas geográficas distintas. 7 isolados são americanos, estes isolados são identificados como RMI1, RMI2, RMI3, RMI5, RMI6, RMI7 e RMI9. 7 isolados são franceses, e são designados A2, F1, G1, G3, F3031, H3-2 e H1-4. Os 4 últimos isolados são ingleses, e são designados 431, 388b, 337 e J5.

As estirpes do painel são acessíveis a partir da requerente após pedido. Estas foram também publicadas num artigo de revisão «*Archives of Virology*» (Poulet *et al. Arch. Virol.* Fevereiro 2000. 145(2). 243-261), disponível

em linha na Internet à data do depósito a partir do. Durante os testes de seroneutralização cruzada entre os 18 isolados de FCV do painel de referência, foi demonstrado, de maneira surpreendente, que o anti-soro do isolado 431 neutraliza 14 de 17 isolados heterólogos do painel de referência (o título homólogo de seroneutralização não é tomado em conta). Por comparação, os anti-soros das estirpes vacinais "históricos" 255 e F9 não neutralizam mais do que 2 de 18 isolados do painel.

De maneira inesperada, a requerente encontrou, com a estirpe FCV 431, uma estirpe dominante que pode ser utilizada para a protecção de felídeos e em particular, de gatos contra a maior parte das estirpes FCV. Graças ao painel de estirpes FCV aqui divulgadas, é possível ao especialista da técnica seleccionar outras estirpes de FCV dominantes. Por equivalência a invenção cobre também através da estirpe FCV 431, as estirpes FCV equivalentes a esta última, possuindo anticorpos de largo espectro de neutralização cruzada.

Existe equivalência uma vez que o anti-soro de uma estirpe FCV seroneutraliza, pelo menos, 13 de 18 isolados heterólogos do painel de referência (ou seja, que incluem FCV 431), preferencialmente, uma vez que seroneutraliza pelo menos, 14 de 18 isolados heterólogos do painel de referência, de maneira ainda mais preferida uma vez que seroneutraliza pelo menos, 15 de 18 isolados heterólogos do painel de referência.

Considera-se geralmente que uma estirpe de FCV seroneutraliza uma outra estirpe de FCV uma vez que o título heterólogo de seroneutralização é superior ou igual a $1,2 \log_{10} VN_{50}$ (Povey C. e Ingersoll J., *Infection and Immunity*, 1975, 11, 877-885). A requerente tomou este valor como início de positividade. Contudo, os resultados de seroneutralização cruzada obtidos por um isolado FCV possuindo um título homólogo de seroneutralização inferior ou igual a $2 \log_{10} VN_{50}$ não podem ser interpretados.

Um segundo método para estabelecer a equivalência de uma estirpe FCV em comparação com a estirpe FCV 431 é utilizar anticorpos monoclonais específicos da estirpe FCV 431 e testar por imunofluorescência indirecta (IFI) a estirpe FCV candidata. A requerente conseguiu ainda produzir vários anticorpos monoclonais que se confirmaram específicos da estirpe 431. Um deles foi denominado 44. Existe equivalência se existir uma reactividade em imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos de 431, por exemplo com o anticorpo monoclonal 44. Este anticorpo monoclonal e o hibridoma correspondente estão disponíveis a partir do da depositador por pedido simples e são também divulgados no artigo de Poulet *et al. supra*. O hibridoma correspondente foi igualmente depositado a 11 de Agosto de 1999 na CNCM sob o número de acesso I-2282. Embora o especialista da técnica seja perfeitamente capaz de produzir anticorpos monoclonais pelas técnicas clássicas e de seleccionar, em relação ao painel, os que são específicos da estirpe 431.

A outra estirpe FCV G1 foi seleccionada pela sua complementaridade em comparação com a estirpe FCV 431, sabendo que a combinação dos anti-soros de 431 e de G1 seroneutralizam 100% dos isolados do painel de referência, ou seja, que a estirpe FCV G1 a um título homólogo de seroneutralização superior ou igual a $2 \log_{10} VN_{50}$ e títulos de seroneutralização heterólogos superiores ou iguais a $1,2 \log_{10} VN_{50}$ em comparação com os isolados FCV do painel de referência contra os quais o anti-soro 431 não seroneutraliza ou o faz fracamente (valor inferior a $1,2 \log_{10} VN_{50}$). A invenção cobre igualmente as estirpes FCV equivalentes possuindo a mesma complementaridade em comparação com a estirpe FCV 431.

Pode-se também produzir e seleccionar anticorpos específicos desta estirpe, o que permite determinar equivalentes nesta outra base.

A requerente conseguiu também isolar, caracterizar e sequenciar o gene da cápside de FCV 431 e FCV G1, a proteína de cápside, e determinou as sequências de ADNc (ADN complementar) correspondentes.

A invenção tem assim, por objectivo um fragmento de ácido nucleico compreendendo toda ou parte da sequência nucleotídica que codifica para a proteína da cápside do vírus 431 em que a sequência de aminoácidos é representada pela SEQ ID NO: 7 ou pela figura 2, ou um fragmento imunologicamente activo desta proteína, ou seja um epitopo,

péptido ou polipéptido conservando substancialmente a actividade imunogénica da proteína da cápside.

A invenção tem, nomeadamente, por objectivo, um fragmento de ADN compreendendo a sequência de ADNc da SEQ ID NO: 6 ou um fragmento conservando as propriedades essenciais da sequência completa, ou seja, que codificam para um péptido, polipéptido ou epitopo conservando substancialmente a actividade imunogénica da proteína da cápside. A invenção tem em particular por objectivo, um fragmento de ADN compreendendo esta sequência de ADNc, nomeadamente acoplada com elementos de regulação da transcrição.

É evidente que a invenção cobre automaticamente os fragmentos de ácido nucleico, fragmentos de ADN e sequências de ADNc equivalentes, ou seja os fragmentos e sequências nucleotídicas específicas da cápside FCV não alteram a funcionalidade nem a especificidade da estirpe da sequência descrita ou dos polipéptidos codificados por esta sequência. Serão, bem entendido, incluídas as sequências que diferem por degenerescência do código.

A invenção cobre igualmente automaticamente as sequências nucleotídicas (ARN, ADN, ADNc) equivalentes às reivindicadas. Trata-se, em particular, de sequências provenientes de estirpes FCV equivalentes de acordo com a definição dada acima em comparação com o painel e/ou o anticorpo monoclonal 44.

A invenção compreende um fragmento de ácido nucleico compreendendo toda ou parte da sequência nucleotídica que codifica para a proteína da cápside do vírus G1 tal como representada pela SEQ ID NO: 5 ou na figura 1, ou um fragmento imunologicamente activo desta proteína, ou seja um epitopo, péptido ou polipéptido conservando substancialmente a actividade imunogénica da proteína da cápside.

A invenção tem, nomeadamente, por objectivo um fragmento de ADN compreendendo a sequência de ADNc da SEQ ID NO: 4 ou um fragmento conservando as propriedades essenciais da sequência completa, ou seja que codifica para um péptido, polipéptido ou epitopo conservando substancialmente a actividade imunogénica da proteína da cápside. A invenção tem, em particular, por objectivo, um fragmento de ADN compreendendo esta sequência de ADNc, nomeadamente acoplada com elementos de regulação da transcrição. É evidente que a invenção cobre automaticamente os fragmentos de ácido nucleico, fragmentos de ADN e sequências ADNc equivalentes, ou seja, os fragmentos e sequências nucleotídicas não alteram a funcionalidade nem a especificidade de estirpe da sequência descrita ou dos polipéptidos codificados por esta sequência. Serão, bem entendido, incluídas as sequências que diferem por degenerescência do código.

A invenção cobre igualmente automaticamente as sequências nucleotídicas (ARN, ADN, ADNc) equivalentes às

reivindicadas. Trata-se, em particular, de sequências nucleotídicas provenientes de estirpes FCV complementares de acordo com o sentido dado acima.

O gene que codifica para a proteína da cápside dos vírus FCV G1 e FCV 431 possui um tamanho de 2007 nucleótidos para FCV 431 e de 2010 nucleótidos para FCV G1. A proteína da cápside possui um tamanho de 668 aminoácidos para FCV 431 e de 669 aminoácidos para FCV G1, e uma massa de 60-65 kDa (proteína p65).

A invenção tem também por objectivo um vector de expressão compreendendo pelo menos, um fragmento de ADN, de acordo com a invenção, em condições que permitem a sua expressão *in vivo*. Seguindo uma modalidade particular, o vector de expressão compreende um ADNc do tipo 431 e um ADNc do tipo G1. Por «do tipo», deve entender-se que o ADNc é complementar de uma sequência de ARN da estirpe considerada.

Estes vectores de expressão podem ser poxvírus, por exemplo o vírus da vacina, os vírus da varíola aviária (varíola do canário, varíola de aves de capoeira), compreendendo os vírus de varíola específicos de espécies (vírus da varíola suíno, varíola de guaxinim e varíola de varíola de camelo), os adenovírus e os herpesvírus, tais como os vírus herpes felinos (e.g. FR-A-2 741 806). Para os vírus da varíola, o especialista da técnica pode reportar-se a WO-A-9215672, WO-A-9526751, WO-A-9012882, e WO-A-9527780.

Podem ser utilizadas várias estratégias de inserção para a expressão de várias sequências nucleotídicas heterólogas a partir do mesmo vector de expressão *in vivo*. Estas estratégias de inserção são nomeadamente a utilização de uma cassette dupla de expressão possuindo, uma orientação oposta, ou a utilização de uma cassette dupla de expressão possuindo uma orientação idêntica, ou ainda uma cassette múltipla de expressão com um elemento " IRES " (Internal Ribosome Entry Site) situado entre cada inserção (patente EP-A1-0803573).

As sequências nucleotídicas heterólogas são inseridas sob a dependência de sinais reguladores da transcrição e nomeadamente de promotores, de preferência colocados durante a inserção. Não está, de todo, excluído fazer expressar estas sequências nucleotídicas heterólogas sob o controlo de sinais próprios no vector de expressão utilizado. Para os vectores de expressão do vírus da varíola dos canários, um dos promotores preferidos é o promotor vacina H6 (Tailor J. *et al. Vaccine*, 1988, 6, 504-508; Guo P. *et al. J. Virol.*, 1989, 63, 4189-4198; Perkus M. *et al. J. Virol.*, 1989, 63, 3829-3836).

Os vectores de expressão *in vivo* podem igualmente ser plasmídeos. O termo plasmídeo pretende cobrir toda a unidade de transcrição de ADN sob a forma de uma sequência polinucleotídica compreendendo uma sequência de ADNc de acordo com a invenção e os elementos necessários à sua

expressão *in vivo*. Foi preferida a forma de plasmídeo circular, super-enrolado ou não. A forma linear entra igualmente no âmbito desta invenção.

Cada plasmídeo compreende um promotor apto a assegurar, nas células hospedeiras, a expressão do ADNc inserido sob a sua dependência. Trata-se, em geral, de um promotor eucariota forte e, em particular, de um promotor precoce do citomegalovírus CMV-IE, de origem humana ou murínea, ou ainda eventualmente de uma outra origem tal como rato, cobaia. De maneira mais geral, o promotor é ou de origem viral, ou de origem celular. Como promotor viral, para além de CMV-IE, pode citar-se o promotor precoce ou tardio do vírus SV40 ou o promotor LTR do vírus do Sarcoma de Rous. Como promotor celular, pode citar-se o promotor de um gene do citoesqueleto, tal como, por exemplo, o promotor da desmina, ou ainda o promotor da actina. Um sub-fragmento destes promotores, conservando a mesma actividade promotora é compreendido na presente invenção, e.g. os promotores CMV-IE truncados de acordo com o documento WO-A-98/00166.

Uma vez que várias sequências heterólogas (ADNc e/ou genes de FCV ou de outros patogénicos felinos) estão presentes no mesmo plasmídeo, estes podem ser apresentados na mesma unidade de transcrição ou em duas unidades diferentes.

Os plasmídeos podem igualmente compreender outros elementos de regulação de transcrição, tais como, por

exemplo, sequências estabilizadoras do tipo intrão, de preferência intrão II do gene da β -globina de coelho (van Ooyen *et al. Science*, 1979, 206: 337-344), sequência sinal da proteína codificada pelo gene do activador do plasminogénio tecidual (tPA; Montgomery *et al. Cell. Mol. Biol.* 1997, 43: 285-292), e sinal de poliadenilação (poliA), nomeadamente do gene da hormona do crescimento bovina (bGH) (US-A-5 122 458) ou do gene da β -globina do coelho.

A invenção tem igualmente por objectivo a utilização de ADNc de acordo com a invenção para a produção *in vitro* de proteínas da cápside ou de seus fragmentos e epitopos imunologicamente activos e sua incorporação nas preparações imunogénicas e vacinas sub-unitárias

A invenção tem igualmente por objectivo uma preparação imunogénica ou uma vacina contra a calicivirose felina compreendendo, pelo menos, um vector de expressão *in vivo* recombinado, de acordo com a invenção e um veículo ou excipiente aceitável no plano veterinário, e eventualmente um adjuvante. A noção de preparação imunogénica cobre toda a preparação susceptível, uma vez administrada ao gato, de induzir, pelo menos, uma resposta imunitária dirigida contra o patogénico felino considerado. Por vacina, entende-se uma preparação capaz de induzir uma protecção eficaz.

De preferência, esta preparação imunológica ou

esta vacina compreende um vector de expressão *in vivo* no qual é inserido um ADNc do tipo FCV 431, incluindo este os seus equivalentes.

De acordo com uma primeira particularidade muito vantajosa, esta preparação imunológica ou esta vacina compreende um vector de expressão no qual é inserido um ADNc do tipo FCV 431, incluindo este os seus equivalentes, e um ADNc do tipo FCV G1, incluindo este também os equivalentes deste último.

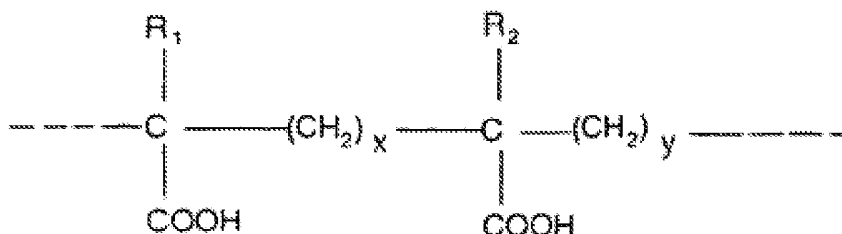
De acordo com uma segunda particularidade muito vantajosa, esta preparação imunológica ou esta vacina compreende, pelo menos, dois vectores de expressão: no primeiro é inserido um ADNc do tipo FCV 431, incluindo este os seus equivalentes, e no segundo um ADNc da estirpe FCV G1, incluindo este também os equivalentes deste último.

Para adjuvar as preparações e vacinas conformes à invenção, podem utilizar-se todos os adjuvantes apropriados conhecidos do especialista da técnica. De qualquer modo, é preferido formular sob a forma de emulsões óleo-em-água, ou juntar-lhe polímeros de ácido acrílico ou metacrílico ou copolímeros de anidrido maleico e de derivados de alcenilo, ou ainda um lípido catiónico contendo um sal de amónio quaternário.

De entre os polímeros, são preferidos os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico reticulados,

nomeadamente por éteres polialcenílicos de açúcares ou de poliálcoois. Estes compostos são conhecidos sob o termo carbómero (Pharmeuropa vol. 8, n° 2, Junho 1996). O especialista da técnica pode também referir-se a US-A-2 909 462 (incorporado por referência) descrevendo tais polímeros acrílicos reticulados por um composto poli-hidroxilado possuindo pelo menos, 3 grupos hidroxilo, de preferência não mais do que 8, os átomos de hidrogénio de, pelo menos, sendo três hidroxilos substituídos por radicais alifáticos insaturados possuindo pelo menos, 2 átomos de carbono. Os radicais preferidos são aqueles contendo de 2 a 4 átomos de carbono, e.g., vinilos, alilos e outros grupos etilenicamente insaturados. Os radicais insaturados podem eles mesmos conter outros substituintes, tal como metilo. Os produzidos vendidos sob a denominação Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) são particularmente apropriados. Estes são reticulados por uma sacarose de alilo ou por alilpentaeritritol. Entre estes, podem citar-se os Carbopol® 974P, 934P e 971 P.

De entre os copolímeros de anidrido maleico e de derivado de alcenilo, são preferidos os EMA® (Monsanto) que são copolímeros de anidrido maleico e de etileno, lineares ou reticulados, por exemplo reticulados pelo diviniléter. Pode referir-se J. Fields et al., *Nature*, 186: 778-780, 4 de 1960 (incorporado por referência). No plano da sua estrutura, os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os EMA® são formados, de preferência, de motivos de base da fórmula seguinte:



em que:

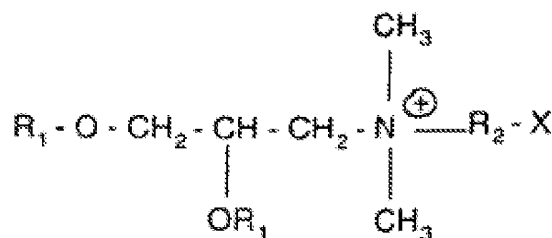
- R_1 e R_2 , idênticos ou diferentes, representam H ou CH_3
- $x = 0$ ou 1 , de preferência $x = 1$
- $y = 1$ ou 2 , com $x + y = 2$

Para os EMA®, $x = 0$ e $y = 2$. Para os carbómeros, $x = y = 1$.

Estes polímeros são dissolvidos em água ou em água fisiológica (NaCl a 20 g/L) e o pH é ajustado a 7,3-7,4 com soda, para obter a solução adjuvante na qual o vector de expressão ou as sub-unidades serão incorporados.

A concentração em polímero na composição vacinal final será de 0,01% a 1,5% P/V, mais particularmente de 0,05 a 1% P/V, de preferência de 0,1 a 0,4% P/V.

Os lípidos catiónicos contendo um sal de amónio quaternário, que são particularmente, mas não exclusivamente adaptados para os vectores de expressão plasmídicos respondem pela fórmula:



em que R₁ é um radical alifático linear, saturado ou insaturado, possuindo de 12 a 18 átomos de carbono, R₂ é um outro radical alifático, contendo 2 ou 3 átomos de carbono, e X um agrupamento hidroxilo ou amina.

É preferido o DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanamônio; WO-A-9634109), de preferência acoplado com um lípido neutro, nomeadamente o DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanolamina), para formar o DMRIE-DOPE. De preferência, a mistura do plasmídeo com este adjuvante faz-se de maneira extemporânea e é preferido, antes da sua administração ao animal, deixar o tempo da mistura assim constituída para se complexar, por exemplo durante 10 a 60 minutos, nomeadamente na ordem dos 30 minutos.

Uma vez que o DOPE está presente, a proporção molar DMRIE:DOPE está, de preferência, entre 95:5 a 5:95, mais particularmente de 1:1.

A proporção ponderal plasmídeo:adjuvante DMRIE ou DMRIE-DOPE pode ir, nomeadamente, de 50:1 a 1:10, nomeadamente de 10:1 a 1:5, de preferência, de 1:1 a 1:2.

Os vectores de expressão *in vivo* que codificam para um ADNc do tipo FCV de acordo com a invenção podem igualmente codificar para o GM-CSF felino ou ser associados a um segundo vector que codifica para o GM-CSF felino (e.g. os plasmídeos pJP089 e pJP090, respectivamente, figura 5 e figura 6). No caso dos plasmídeos, é preferida uma mistura de dois plasmídeos. No caso de vectores virais, é preferido um só vector. Este vector de expressão ou esta mistura de vectores de expressão pode também ser adjuvada, tal como descrito anteriormente.

A invenção tem também por objectivo uma preparação imunogénica multivalente ou uma vacina multivalente contra a calicivirose felina e contra pelo menos, um outro patogénico felino, utilizando um mesmo vector de expressão *in vivo* recombinado contendo e expressando pelo menos, um ADNc do tipo FCV de acordo com a invenção e pelo menos, uma sequência nucleotídica de um imunogénico de um outro patogénico felino ou de um fragmento imunologicamente activo desse imunogénico.

A invenção tem igualmente por objectivo uma preparação imunogénica multivalente ou uma vacina multivalente compreendendo, pelo menos, um vector de expressão *in vivo* no qual é inserida pelo menos, um ADNc do tipo FCV de acordo com a invenção e pelo menos, um segundo vector de expressão no qual é inserida uma sequência que codifica para um imunogénico, ou um fragmento imunologicamente

activo, de um outro patogénico felino. Os plasmídeos apropriados nos quais é inserida uma sequência que codifica para um imunogénico, ou um fragmento imunologicamente activo, de um outro patogénico felino, pode ser, nomeadamente estes descritos nos exemplos 7 a 15 e 17 a 19 do pedido de patente WO-A-9803660 (pPB179, pPB180, pPB181, pAB009, pAB053, pAB052, pAB056, pAB058, pAB029, pAB030, pAB083, pAB041).

As vacinas recombinantes monovalentes ou multivalentes, tais como descrito anteriormente, podem igualmente ser associadas com pelo menos, um vacina clássica (inactivada, viva atenuada, sub-unidades) dirigida contra, pelo menos, um patogénico felino idêntico ou diferente.

Os referidos outros patogénicos felinos são seleccionados entre, nomeadamente, o grupo compreendendo o vírus da rinotraqueíte felina ou vírus herpes felino (FHV), o vírus da leucemia felina (FeLV), os parvovírus felinos (FPV), o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da raiva, *Chlamydia*.

A invenção compreende as proteínas da cápside isoladas, purificadas ou sintéticas, da estirpe FCV431 e da estirpe FCV G1, possuindo a sequência em aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, respectivamente SEQ ID. NO: 5. Esta cobre automaticamente as proteínas equivalentes, ou seja marcas de estirpes equivalentes às estirpes FCV 431 e

FCV G1 seguindo as definições dadas acima (construção do painel e/ou de um anticorpo monoclonal, nomeadamente, o anticorpo monoclonal 44). Vantajosamente estas proteínas da cápside podem ser montadas sob forma de cápsides vazias.

A invenção tem também por objectivo os fragmentos e epitopos (pelo menos, cerca de 8 a 10 aminoácidos) das proteínas, que conservam a especificidade e a imunogenicidade da proteína inteira.

As proteínas da cápside, eventualmente montadas sob a forma de cápsides vazias, e seus fragmentos e epitopos, podem ser produzidas por expressão *in vitro*. A sequência nucleotídica correspondente é inserida num sistema de expressão *in vitro* e expressa por este sistema, e o produto de expressão recolhido e eventualmente purificada, como é conhecida.

O sistema de expressão pode ser de origem viral, em particular o baculovírus (US-A-4 745 051). Integra-se a sequência que codificante ou um fragmento (no caso do epitopo ou do fragmento) no genoma do baculovírus (e.g. o baculovírus, Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica*, AcNPV) e este último é depois propagado, nomeadamente em células de insectos, e.g. *Spodoptera frugiperda* Sf9 (depósito ATCC CRL 1711).

O sistema de expressão *in vitro* pode ser de origem procariota, e.g. *Escherichia coli*, ou eucariota, em

particular leveduras, e.g. *Saccharomyces cerevisiae*, ou células eucariotas de mamíferos, nomeadamente linhas celulares tais como CHO (células de ovário de hamster), HeLa, BHK ou células de insectos, e.g. *Spodoptera frugiperda* (*supra*), ou ainda células felinas.

Como promotores utilizáveis nestas construções celulares, podem citar-se os promotores virais fortes tais como os do vírus SV40 (Fiers *et al.*, *Nature*, (1978) 273: 113) e o promotor precoce (CMV-IE) do vírus CMV ou citomegalovírus humano (McGregor e Caskey, *Nucleic Acids Res.* 17: 2365, 1989), muríneo ou de uma outra origem, ou ainda o do gene poliedrina do Baculovírus AcNPV (Hooft van Iddekinge *et al.*, 1983, *Virology* 131: 561-565).

O especialista da técnica sabe como purificar e/ou isolar as proteínas, montadas ou não, sob forma de cápsides vazias, seus fragmentos e epitopos a partir do produto das técnicas descritas acima. A título de exemplo, pode lembrar-se que o especialista da técnica tem à sua disposição diferentes métodos que compreendem, nomeadamente: precipitação baseada na solubilidade das proteínas, fragmentos e epitopos de interesse em função das condições salinas do meio, precipitação por solventes orgânicos, polímeros e outras matérias, precipitação de afinidade e desnaturação selectiva, cromatografia em coluna, compreendendo cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC), cromatografia de troca iónica, cromatografia de afinidade, cromatografia de imunoafinidade, cromatografia utilizando

ligandos, imunoprecipitação, filtração em gel, electroforese, métodos de filtração, nomeadamente, ultrafiltração, e ultra-centrifugação em gradiente.

O especialista da técnica pode reportar-se, a título de exemplo, a K.Y. Green *et al.*, *J. Clin. Microb.*, Julho de 1997, Vol 35, 7: 1909-1914, para a produção de cápsides em baculovírus propagadas em células Sf9 e recolhidas por ultra-centrifugação em gradientes de sacarose (10 a 50%).

As proteínas da cápside, e seus fragmentos e epitopos, podem também ser produzidos por síntese química pelos métodos à disposição da especialista da técnica.

A invenção compreende as preparações imunogénicas e vacinas compreendendo pelo menos, um antigénio sub-unitário formado por uma proteína da cápside, de preferência montada sob a forma de cápsides vazias, de FCV 431 e/ou FCV G1, ou de um fragmento ou epitopo correspondente, num veículo ou excipiente aceitável no plano veterinário, e de preferência um adjuvante. De preferência, as preparações e vacinas de acordo com a invenção compreendem antigénios sub-unitários provenientes de duas estirpes FCV 431 e FCV G1. Além disso, as preparações e vacinas podem compreender proteínas da cápside não montadas e proteínas montadas sob forma de cápsides vazias.

Para adjuvar as preparações imunogénicas e vaci-

nas sub-unitárias de acordo com a invenção, pode utilizar-se, a título de adjuvante (1) hidróxido de alumínio, (2) um polímero de ácido acrílico ou metacrílico, um polímero de anidrido maleico e de derivado de alcenilo (descritos acima), ou (3) formular a preparação imunogénica ou vacina sob forma de uma emulsão óleo-em-água, em particular, a emulsão SPT descrita p 147 «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach» editada por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, e a emulsão MF59 descrita p183 da mesma obra.

A emulsão óleo-em-água pode ser, nomeadamente, à base de óleo de parafina líquida suave (do tipo Farmacopeia europeia); de óleo isoprenóide, tal como o esqualano, o esqualeno; de óleo resultante da oligomerização de alcenos, em particular, de isobuteno ou de deceno; de ésteres de ácidos ou de álcoois de agrupamento alquilo linear, mais particularmente, os óleos vegetais, o oleato de etilo, o di(caprilato/caprato) de propilenoglicol, o tri(caprilato/caprato) de glicerol, o dioleato de propilenoglicol; ésteres de ácidos ou de álcoois gordos ramificados, em particular, ésteres do ácido isoesteárico. O óleo é utilizado em associação com emulsificantes para formar a emulsão. Os emulsificantes são, de preferência, agentes tensioactivos não iónicos, em particular, os ésteres de sorbitano, de manido, de glicerol, de poliglicerol, de propilenoglicol e de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico, hidroxiesteárico, eventualmente etoxilados, os blocos copolímeros polioxipropileno-polioxietileno, em particular, os Pluronic®, nomeadamente L121.

A invenção tem também por objectivo as preparações imunogénicas e vacinas multivalentes nas quais a valência FCV é uma valência sub-unitária como descrito acima.

A presente invenção tem também por objectivo um método de imunização de gatos, contra as doenças devidas aos vírus da calicivirose felina.

Este método compreende a administração de uma preparação imunológica ou de uma vacina, de acordo com a invenção, a gatos. Esta administração pode fazer-se, nomeadamente, pela via parentérica, por administração subcutânea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal. De preferência, a administração faz-se pela via subcutânea ou intramuscular.

Podem ser utilizados diferentes meios de administração para as preparações imunogénicas e as vacinas plasmídicas, nomeadamente, partículas de ouro revestidas com ADN e projectadas de modo a penetrar nas células da pele do sujeito a imunizar (Tang *et al.* *Nature* 1992. 356. 152-154) e os injectores por jacto líquido que permite transfetar à vez células da pele e células de tecidos subjacentes (Furth *et al.* *Analytical Bioch.* 1992. 205. 365-368).

O especialista da técnica possui as competências necessárias para definir precisamente o número da administração e as doses a utilizar para cada protocolo de imunização.

A invenção vai ser agora descrita mais em detalhe com o auxílio de modos de realização tomados a título de exemplos não limitativos e referem-se à figura na qual:

Figura 1: Sequência de ADNc e da proteína «cápside» da estirpe FCV G1

Figura 2: Sequência de ADNc e da proteína «cápside» da estirpe FCV 431

Figura 3: Mapa de restrição do plasmídeo pJCA151

Figura 4: Sequência da região C6L do genoma do vírus da varíola dos canários (estirpe ALVAC)

Figura 5: Mapa de restrição do plasmídeo pJP089

Figura 6: Sequência do gene GM-CSF felino 3R3

Figura 7: Mapa de restrição do plasmídeo pJP090

Figura 8: Sequência do gene GM-CSF felino 3R4

Figura 9: Quadro dos títulos de seroneutralização cruzada

Lista das seqüências para as construções da presente invenção

- SEQ ID NO 1: Oligonucleótido PB331
- SEQ ID NO 2: Oligonucleótido PB333
- SEQ ID NO 3: Oligonucleótido PB332
- SEQ ID NO 4: Sequência de ADNc da cápside de FCV G1
- SEQ ID NO 5: Sequência da proteína da cápside de FCV G1
- SEQ ID NO 6: Sequência de ADNc da cápside de FCV 431
- SEQ ID NO 7: Sequência da proteína da cápside de FCV 431
- SEQ ID NO 8: Oligonucleótido JCA289
- SEQ ID NO 9: Oligonucleótido JCA290
- SEQ ID NO 10: Sequência da região C6L do vírus da varíola dos canários (estirpe ALVAC)
- SEQ ID NO 11: Oligonucleótido C6A1
- SEQ ID NO 12: Oligonucleótido C6B1
- SEQ ID NO 13: Oligonucleótido C6C1
- SEQ ID NO 14: Oligonucleótido C6D1
- SEQ ID NO 15: Oligonucleótido JCA291
- SEQ ID NO 16: Oligonucleótido JCA292
- SEQ ID NO 17: Oligonucleótido JCA293
- SEQ ID NO 18: Oligonucleótido JCA294
- SEQ ID NO 19: Oligonucleótido JCA295
- SEQ ID NO 20: Oligonucleótido JP578
- SEQ ID NO 21: Oligonucleótido JP579
- SEQ ID NO 22: Sequência do gene GM-CSF felino 3R3
- SEQ ID NO 23: Sequência do gene GM-CSF felino 3R4

EXEMPLOS

Todas as construções de plasmídeos foram realizadas utilizando as técnicas convencionais de biologia molecular (clonagem, digestão por enzimas de restrição, síntese de um ADN complementar de cadeia simples, amplificação em cadeia por polimerase, alongação de um oligonucleótido por uma ADN polimerase...) descritas por Sambrook J. *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nova Iorque. 1989). Todos os fragmentos de restrição utilizados para a presente invenção, assim como os diversos fragmentos de amplificação em cadeia por polimerase (= ACP ou PCR), foram isolados e purificados utilizando o kit "GeneClean7" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Exemplo 1: Isolamento e cultura de estirpes das calicivírus felino G1 e 431

A estirpe de calicivírus felino designada G1 foi obtida a partir de uma recolha realizada em França num gato que apresentava sinais de calicivirose. Esta estirpe FCV G1 foi depositada a 12 de Março de 1999 na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (ou CNCM) do Instituto Pasteur, Paris, França, sob o número de acesso I-2167.

A estirpe de calicivírus felino designada 431 foi isolada a partir de uma recolha realizada em Inglaterra,

num gato que apresentava sinais de calicivirose. Esta estirpe FCV 431 foi depositada a 12 de Março de 1999 na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (ou CNCM) do Institut Pasteur, Paris, França, sob o número de acesso I-2166.

Para a sua amplificação, as estirpes de calicivírus felino foram cultivadas em células da linha de rim de gato (Crandell-Reese Feline Kidney ou CRFK, N° ATCC CCL-94, Crandell *et al.* *In Vitro* 1973, 9, 176-185).

As células CRFK são colocadas em cultura em placa de 96 poços ou em Falcon de 25 cm² com meio DMEM suplementado com soro de vitela fetal a 5% contendo cerca de 100 000 células por mL. As células são cultivadas a +37 °C em atmosfera contendo CO₂ a 5%.

Após 3 dias a camada celular chega à confluência. O meio de cultura é então substituído por meio DMEM sem soro mas suplementado com 50 mg/L de gentamicina e os isolados virais FCV são adicionados à razão de um volume de 100 µL de diluições seriadas de quarto em quarto por poço para a clonagem em diluições limites dos vírus FCV ou de 1 mL por Falcon.

Quando o efeito citopático (CPE) é completo (24-48 horas após o início da cultura), as suspensões virais são recolhidas e congeladas a -70° C. São geralmente necessárias 3 a 4 passagens sucessivas para a produção de um lote viral. O lote viral é armazenado a -70° C.

Exemplo 2: Extracção de ARN viral das estirpes G1 e 431 de calicivírus felino

As células CRFK são cultivadas a 37 °C em frascos rolantes de 2 litros (850 cm²) em meio Eagle modificado (MEM, Gibco BRL) suplementado com 2,5% de hidrolisado de lactalbumina (Gibco BRL) e de soro de vitela fetal a 5% (Gibco BRL). Adiciona-se, por cada frasco rolante 300 mL de uma suspensão celular em meio MEM a cerca de 100 000 células/mL. Após 3 dias, a camada celular é confluenta. O meio de cultura celular é então substituído por meio MEM sem soro e o vírus FCV é adicionado a uma multiplicidade de infecção (moi) de 0,5 DIC₅₀/célula. A cultura viral é mantida a 37 °C durante 24 a 48 horas até à obtenção de um efeito citopático para a montagem do tapete celular. A suspensão viral é recolhida, depois clarificada por centrifugação.

O ARN viral contido em 100 mL de suspensão viral da estirpe FCV G1, que foi preparada foi extraída com as soluções do kit «High Pure™ Viral RNA Kit» Cat # 1 858 882, Roche Molecular Biochemicals), seguindo as instruções do fabricante para as etapas de extracção. O sedimento de ARN obtido no final da extracção foi ressuspenso com 10 mL de água destilada estéril sem RNase.

O ARN viral da estirpe FCV 431 foi extraído nas mesmas condições a partir de 100 mL de suspensão viral da

estirpe correspondente. O sedimento de ARN obtido no final da extracção foi ressuspenso com 10 mL de água destilada estéril sem RNase.

Exemplo 3: Síntese dos ADN complementares dos genes das cápsides das estirpes G1 e 431 de calicivírus felino

Os ADN complementares correspondentes aos genes das cápsides das estirpes G1 e 431 de calicivírus felino foram sintetizados com o kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) utilizando as condições fornecidas pelo fabricante.

Para a estirpe FCV G1, uma reacção de transcrição inversa, seguida de uma reacção de amplificação em cadeia (Reacção «TI-ACP» ou «RT-PCR») foi realizada com 1 mL da suspensão de ARN viral FCV G1 (exemplo 2) e com os seguintes oligonucleótidos:

PB331 (33 mero) (SEQ ID NO 1)

5' TTGCGGCCGCTGTGATGTGTTCGAAGTTTGAGC 3' e

PB333 (36 mero) (SEQ ID NO 2)

5' TTGGCGCCGYTGACCMAGTGCAGCYTTRTCCAATTC 3'

As condições de síntese da primeira cadeia de ADN complementar são uma temperatura de 42 °C durante 15 min, depois 99 °C durante 5 min, e finalmente 4 °C durante 5 min. As condições da reacção de ACP são uma temperatura de 95 °C durante 2 min, depois 35 ciclos (95 °C durante 1 min,

depois 62 °C durante 1 min, e 72 °C durante 2 min), e finalmente 72 °C durante 7 min para produzir um fragmento RT-PCR de cerca de 2000 pares de bases (pb) que foi identificado como «G1-4».

Para a estirpe FCV 431, uma reacção de transcrição inversa, seguida de uma reacção de amplificação em cadeia (Reacção «TI-ACP» ou «RT-PCR») foi realizada com 1 mL da suspensão de ARN viral FCV 431 (exemplo 2) e com os seguintes oligonucleótidos:

PB331 (33 mero) (SEQ ID NO 1)

e PB332 (38 mero) (SEQ ID NO 3)

5' TTGGCGCCAAYWGTRTTWGHTACAGTRTCAATYARRCC 3'

As condições de síntese da primeira cadeia de ADN complementar são uma temperatura de 42 °C durante 15 min, depois 99 °C durante 5 min, e finalmente 4 °C durante 5 min. As condições da reacção ACP são uma temperatura de 95 °C durante 2 min, depois 35 ciclos (95 °C durante 1 min, depois 62 °C durante 1 min, e 72 °C durante 2 min), e finalmente 72 °C durante 7 min para produzir um fragmento RT-PCR de cerca de 2000 pares de bases (pb) que foi identificado como «431-2».

Exemplo 4: Clonagem do gene que codifica para a proteína da cápside da estirpe G1 do calicivírus felino

O fragmento de RT-PCR «G1-4» foi digerido por *NarI* depois por *NotI* para isolar, após electroforese em gel

de agarose, o fragmento *NarI-NotI* de cerca de 2000 pb. Este fragmento foi ligado com o vector pBlueScript® II KS+ (Cat # 212208 Stratagene Inc., La Jolla, CA 92037, USA), previamente digerido por *NotI* e *ClaI*, depois desfosforilado, para dar o plasmídeo pG1-4-5 (5033 pb).

O fragmento *NotI-NarI* clonado no plasmídeo foi totalmente sequenciado em ambas as cadeias para determinar a sequência do gene da cápside. A sequência do gene da cápside da estirpe FCV G1 (2010 pb) (SEQ ID NO 4), assim como a sequência da proteína da cápside (p65) (668 aminoácidos) (SEQ ID NO 5) codificada por este gene, são apresentados na figura 1.

Exemplo 5: Clonagem do gene que codifica para a proteína da cápside da estirpe 431 do calicivírus felino

O fragmento RT-PCR «431-2» foi digerido por *NarI* depois por *NotI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, o fragmento *NarI-NotI* de cerca de 2000 pb. Este fragmento foi ligado ao vector pBlueScript® II KS+ (Cat # 212208 Stratagene Inc., La Jolla, CA 92037, USA), previamente digerido por *NotI* e *ClaI*, depois desfosforilado, para dar o plasmídeo p431-2-1 (4985 pb).

O fragmento *NotI-NarI* clonado no plasmídeo foi totalmente sequenciado nas duas cadeias para determinar a sequência do gene da cápside. A sequência do gene da cápside da estirpe FCV 431 (2007 pb) (SEQ ID NO 6), assim

como a sequência da proteína da cápside (p65) (668 amino-ácidos) (SEQ ID NO 7) codificada por este gene, são apresentados na figura 2.

Exemplo 6: Construção do plasmídeo pJCA151

Foi realizada uma reacção ACP utilizando o plasmídeo p431-2-1 (exemplo 5) como matriz e os seguintes oligonucleótidos:

JCA289 SEQ ID NO 8 (36 mero):

5' AAACGCGTCGACATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTG 3'

e JCA290 SEQ ID NO 9 (33 mero):

5' TTTTGATATCTCATATTTTAACCATTCCACTCC 3'

para amplificar um fragmento ACP de cerca de 2030 pb. Este fragmento foi digerido com as enzimas de restrição *SalI* e *EcoRV* para isolar, após electroforese em gel de agarose, um fragmento *SalI-EcoRV* de 2014 pb. Este fragmento de restrição é então ligado ao plasmídeo pVR1012 (Hartikka J. *et al. Human Gene Therapy*. 1997. 7. 1205-1217), previamente digerido por *SalI* e *EcoRV*, para produzir o plasmídeo pJCA151 (6908 pb) (Figura 3).

Exemplo 7: Construção do plasmídeo dador para a inserção no sítio C6L do vírus da varíola dos canários

A figura 4 (SEQ ID NO 10) apresenta a sequência de um fragmento de 3700 pb de ADN genómico do vírus da varíola do canário. A análise desta sequência revelou uma

grelha de leitura aberta (COL) que foi denominada C6L, que começa na posição 377 e termina na posição 2254. A construção de um plasmídeo de inserção resultante da deleção do COL C6L e a sua substituição por um sítio de clonagem múltipla flanqueado por sinais de terminação de transcrição e de tradução foi realizada como descrito acima.

Foi realizada uma reacção ACP a partir da matriz constituída por ADN genómico do vírus da varíola do canário e com os seguintes oligonucleótidos:

C6A1 (SEQ ID NO 11) (42 mero)

5' ATCATCGAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT 3'

e C6B1 (SEQ ID NO 12) (73 mero)

**5'GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCATTTTTTC
GTAAGTAAGTATTTTTATTAA 3'**

para isolar um fragmento ACP de 432 pb (fragmento A).

Foi realizada uma reacção ACP a partir da matriz constituída por ADN genómico do vírus da varíola do canário e com os seguintes oligonucleótidos:

C6C1 (SEQ ID NO 13) (72 mero) e

**5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTCAAATGAG
TATATATAATTGAAAAAGTAA 3'**

C6D1 (SEQ ID NO 14) (45 mero)

5' GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAACTTAAGTTG 3'

para isolar um fragmento ACP de 1210 pb (fragmento B).

Os fragmentos A e B foram hibridados em conjunto para servir de matriz a uma reacção ACP realizada com os oligonucleótidos C6A1 (SEQ ID NO 11) e C6D1 (SEQ ID NO 14) para gerar um fragmento ACP de 1630 pb. Esse fragmento foi digerido pelas enzimas de restrição *SacI* e *KpnI*, para isolar, após electroforese em gel de agarose, um fragmento *SacI-KpnI* de 1613 pb. Esse fragmento foi ligado ao vector pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Cat # 212205), previamente digerido pelas enzimas *SacI* e *KpnI*, para originar o plasmídeo pC6L. A sequência deste plasmídeo foi verificada por sequenciação. Este plasmídeo contém 370 pb de sequências situadas a montante do COL C6L («braço flanqueador esquerdo C6»), um sinal vacina de terminação precoce de transcrição, codões de terminação nas 6 fases de leitura, um sítio de clonagem múltipla contendo os sítios de restrição *SmaI*, *PstI*, *XhoI* e *EcoRI*, e finalmente 1156 pb de sequências situadas a jusante do COL C6L («braço flanqueador direito C6»).

O plasmídeo pMP528HRH (Perkus M. *et al.* *J. Virol.* 1989. 63. 3829-3836) foi utilizado como matriz para amplificar a sequência completa do promotor da vacina H6 (Nº de acesso do GenBank M28351) com os seguintes oligonucleótidos:

JCA291 (SEQ ID NO 15) (34 mero)

5' AAACCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG 3'

e JCA292 (SEQ ID NO 16) (43 mero)

5' AAAAGAATTCGTCTGACTACGATACAACTTAACGGATATCGCG 3'

para amplificar um fragmento ACP de 149 pb. Este fragmento foi digerido pelas enzimas de restrição *SmaI* e *EcoRI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, um fragmento de restrição *SmaI-EcoRI* de 138 pb. Este fragmento é então ligado ao plasmídeo pC6L, previamente digerido por *SmaI* e *EcoRI*, para originar o plasmídeo pJCA150.

Exemplo 8: Construção do vírus recombinado vCP1710 (vírus da varíola do canário recombinado expressando o gene da cápside da estirpe FCV 431)

Foi realizada uma reacção ACP utilizando o plasmídeo p431-2-1 (exemplo 5) como matriz e os seguintes oligonucleótidos:

JCA293 (SEQ ID NO 17) (55 mero):

**5'AAATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTGCTCAACCTGCGCTAA
CGTG 3'**

e JCA294 (SEQ ID NO 18) (33 mero):

5' TTTTGTCTGACTCATATTTTAACCATTCCACTCC 3'

para amplificar um fragmento ACP de cerca de 2050 pb. Este fragmento foi digerido com as enzimas de restrição *NruI* e *SalI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, o fragmento *NruI-SalI* de 2035 pb (fragmento A). O plasmídeo pJCA150 (exemplo 7) foi digerido pelas enzimas de restrição *NruI* e *SalI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, o fragmento de restrição *NruI-SalI* de cerca de 4500 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram então ligados um ao outro para originar o plasmídeo pJCA152. O plasmídeo pJCA152 foi linearizado por *NotI*, depois transfectado nas células primárias de embriões de galinha infectadas com o vírus da varíola do canário (estirpe ALVAC) de acordo com a técnica de precipitação com fosfato de cálcio previamente descrita (Panicali e Paoletti *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1982. 79. 4927-4931; Piccini *et al.* em *Methods in Enzymology.* 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press). As placas positivas foram seleccionadas sobre a base de uma hibridação com uma sonda marcada radioactivamente específica do gene da cápside da estirpe FCV 431. Estas placas foram sujeitas a 4 ciclos sucessivos de selecção/purificação de placas até ser isolada uma população pura. Uma placa representativa da recombinação *in vitro* entre o plasmídeo dador pJCA152 e o genoma do vírus da varíola dos canários ALVAC foi agora amplificada e o stock de vírus recombinado obtido foi designado vCP1710.

Exemplo 9: Construção do vírus recombinado vCP1711 1 (vírus da varíola dos canários recombinado expressando o gene da cápside da estirpe FCV G1)

Foi realizada uma reacção ACP utilizando o plasmídeo pG 1-4-5 (exemplo 4) como matriz e os seguintes oligonucleótidos:

JCA293 (SEQ ID NO 17)

e JCA295 (SEQ ID NO 19) (33 mero):

5' TTTTGTCGACTCATAGTTTTGTCATAGTACTCC 3'

para amplificar um fragmento ACP de cerca de 2050 pb. Este fragmento foi digerido com as enzimas de restrição *NruI* e *SalI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, um fragmento *NruI-SalI* de 2035 pb (fragmento A). O plasmídeo pJCA150 (exemplo 7) foi digerido pelas enzimas de restrição *NruI* e *SalI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, o fragmento de restrição *NruI-SalI* de cerca de 4500 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram então ligados um ao outro para originar o plasmídeo pJCA153.

O plasmídeo pJCA153 foi linearizado por *NotI*, depois transfectado para células primárias de embriões de galinhas infectados com o vírus da varíola dos canários (estirpe ALVAC) de acordo com a técnica de precipitação com fosfato de cálcio previamente descrita (Panicali e Paoletti *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1982. 79. 4927-4931; Piccini *et al.* em *Methods in Enzymology.* 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. e

Grossman L. Academic Press). As placas positivas foram seleccionadas com base numa hibridação com uma sonda marcada radioactivamente específica do gene cápside da estirpe FCV G 1. Estas placas passaram por 4 ciclos sucessivos de selecção/purificação de placas até ser isolada uma população pura. Foi então amplificada uma placa representativa da recombinação *in vitro* entre o plasmídeo dador pJCA152 e o genoma do vírus da varíola dos canários ALVAC e o stock de vírus recombinado obtido foi designado vCP1711.

Exemplo 10: Plasmídeo que codifica para o GM-CSF felino

Foi recolhido sangue de gato por colheita do sangue num tubo contendo de EDTA. As células mononucleadas foram recolhidas por centrifugação num gradiente de Ficoll, depois colocadas em cultura em placa de Petri de 60 mm de diâmetro. As células mononucleadas de gato foram então estimuladas com concanavalina A (ConA) (concentração final de cerca de 4 µg/mL) e com fito-hemaglutinina (PHA) (concentração final de cerca de 10 µg/mL). Após estimulação, os linfoblastos "ConA" e "PHA" foram recolhidos por raspagem das caixas de cultura, e o ARN total destas células foi extraído utilizando o kit "mRNA isolation kit for White Blood Cells" (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 1 934 325).

O ARN total extraído dos linfoblastos de gato estimulados pela ConA e a PHA serviu de matriz para a sín-

tese da primeira cadeia de ADN complementar. Esta primeira cadeia do ADN complementar foi produzida por alongamento do oligonucleótido p(dT)15 (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 814 270). O ADN complementar de cadeia simples obtido foi de seguida utilizado como matriz para uma reacção de ACP com os seguintes oligonucleótidos:

JP578 (SEQ ID NO 20) (33 mero)

5' TATGCGGCCGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTG 3'

e JP579 (SEQ ID NO 21) (36 mero)

5' TATGCGGCCGCTACGTATCACTTCTTGACTGGTTTC 3'

para amplificar um fragmento de ACP de cerca de 450 pares de bases (pb). Este fragmento foi digerido por *NotI* para isolar, após electroforese em gel de agarose, o fragmento *NotI-NotI* de 450 pb. Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pVR1012 (Hartikka J. *et al. Human Gene Therapy*. 1997. 7. 1205-1217). Dois clones contendo a sequência de GM-CSF felino (SEQ ID NO 22 e SEQ ID NO 23), na orientação correcta em relação ao promotor hCMV/IE foram identificados como respectivamente pJP089 e pJP090. Estes dois plasmídeos possuem uma cauda de 5364 pb (Figuras 5 e 7).

A sequência do gene GM-CSF felino clonado no plasmídeo pJP089 contém 13 diferenças ao nível nucleotídico com a sequência de GM-CSF felino disponível no GenBank (nº de acesso AF053007). A alteração mais importante é uma alteração C -> T que origina um alteração Leucina ->

Fenilalanina para o aminoácido (primeira base do codão do aminoácido # 107; Figura 6). A sequência do gene GM-CSF felino clonado no plasmídeo pJP090 é equivalente aquela contida no plasmídeo pJP089, excepto que a alteração Leucina → Fenilalanina não existe para o aminoácido # 107 (Figura 8). A verificação da sequência 3' do gene GM-CSF felino através do kit 3' RACE demonstrou que, nesta posição 107, pode ter-se no mesmo gato, o aminoácido Leucina ou o aminoácido Fenilalanina.

Exemplo 11: Fabrico de vacinas plasmídicas associadas

Os diversos plasmídeos necessários à fabricação de uma vacina associada são misturados. Estes plasmídeos podem ser nomeadamente os descritos nos exemplos 6 e 10 (pJCA151, pJP089 e pJP090) e os exemplos 7 a 15 e 17 a 19 do pedido de patente WO-A-9803660 (pPB179, pPB180, pPB181, pAB009, pAB053, pAB052, pAB056, pAB058, pAB029, pAB030, pAB083, pAB041). As misturas são realizadas de maneira que a concentração final de cada plasmídeo corresponde à dose eficaz de cada plasmídeo. As soluções utilizáveis para ajustar a concentração final da vacina podem ser uma solução de NaCl a 0,9%, ou tampão PBS.

Exemplo 12: Formulação dos plasmídeos vacinais

A solução de ADN contendo um ou vários plasmídeos de acordo com o exemplo 11 é concentrada por precipitação

etanólica como descrito em Sambrook *et al.* (1989). O precipitado de ADN é dissolvido numa solução de NaCl 0,9% de maneira a obter uma concentração de 1 mg/mL. É preparada uma solução de DMRIE-DOPE a 0,75 mM por dissolução de um liofilizado de DMRIE-DOPE por um volume adaptado de H₂O estéril.

A formação dos complexos de ADN plasmídico-lípido é realizada por diluição em partes iguais da solução de DMRIE-DOPE 0,75 mM na solução de ADN a 1 mg/mL em NaCl 0,9%. A solução de ADN é introduzida progressivamente com o auxílio de uma agulha de calibre 26G ao longo da parede do frasco contendo a solução de lípido catiónico de forma a evitar a formação de mousse. Procede-se a uma agitação suave a partir da mistura das duas soluções. Obtém-se no final uma composição compreendendo 0,375 mM de DMRIE-DOPE e 500 µg/mL de plasmídeo.

É adequado que o conjunto das soluções utilizadas esteja à temperatura ambiente para o conjunto das operações descritas acima. Deixa-se que a complexação ADN/DMRIE-DOPE ocorra à temperatura ambiente durante 30 minutos antes de proceder à imunização dos animais.

Exemplo 13: Formulação dos vectores de vírus de varíola dos canários vacinais

Para a preparação de vacinas, os vírus recombinados da varíola de canários vCP1710 (exemplo 8) e vCP1711

(exemplo 9) podem ser adjuvados com soluções de carbómero. O carbómero preferido é o Carbopol™ 974P fabricado por BF Goodrich, Ohio, USA (peso molecular de cerca de 3 000 000).

Uma solução stock a 1,5% de Carbopol™ 974P é inicialmente preparada em água destilada contendo 1 g/L de cloreto de sódio. Esta solução de armazenamento é então utilizada para elaboração de uma solução a 4 mg/mL de Carbopol™ 974P em água fisiológica. A solução de armazenamento é misturada com o volume adequado de água fisiológica, seja numa etapa única, seja em várias etapas sucessivas, o valor do pH é ajustado a cada etapa com uma solução de hidróxido de sódio 1 N (ou ainda mais concentrado) afim de obter um valor final de pH de 7,3-7,4.

A solução de Carbopol™ 974P pronta a usar assim obtida pode ser utilizada para recuperar os vírus recombinados liofilizados (e.g. vCP1710, vCP1711) ou para diluir as soluções de armazenamento concentradas de vírus recombinados (e.g. vCP1710, vCP1711). Por exemplo, para obter uma suspensão viral contendo 108 pfu por dose de 1 mL, pode diluir-se uma solução viral de armazenamento de maneira a obter um título de 108,3 pfu/mL, depois diluir em partes iguais com a referida solução de Carbopol™ 974P pronta a usar a 4 mg/mL.

Exemplo 14: Testes de imunofluorescência indirecta (IFI)

Os testes IFI são efectuados em placas de 96

poços contendo as células CRFK cultivadas em monocamadas e infectadas pelos vírus FCV a testar.

São colocadas em cultura em placa de 96 poços 200 μ L por cúpula de uma suspensão de células CRFK a 90 000 células/mL em meio F15 (Gibco BRL, Cat # 045-1075) contendo 5% de soro de vitela fetal. Na confluência, 320 DICC₅₀ de FCV são inoculados sob 100 μ L de meio F15. Quando as primeiras entradas de ECP aparecem, as células são então lavadas por PBS sem cálcio nem magnésio (PBS, Sigma) frio, depois fixadas a -20° C durante 30 minutos por acetona fria contendo 5% v/v de água. Após secagem, as células infectadas e fixadas são colocadas em contacto durante 30 minutos a 37° C com 100 μ L por cúpula de líquido ascítico correspondente ao anticorpo monoclonal 44 anti-FCV 431 (hibridoma 431 2 0 17 E9 T, depositado na CNCM sob o número de acesso I-2282), diluído cerca de 1/5000 no tampão TRIS-HCl a 50 mM pH 7,6.

Após duas lavagens em PBS, a fixação do anticorpo é revelada por incubação nas mesmas condições de um anticorpo de cabra anti-IgG de murganho conjugado com isotianato de fluoresceína (Biosys, conjugado FITC a 2mg/mL) e diluído a 1/150 em tampão TRIS-HCl a 50 mM pH 7,6. A leitura é feita sob microscópio óptico em luz UV.

Este anticorpo monoclonal foi testado em compa-

ração com cada um dos isolados do painel. Fixou-se exclusivamente sobre as células CRFK infectadas pelo FCV 431.

Este teste pode ser utilizado para determinar os equivalentes da estirpe FCV 431. Estes equivalentes são aqueles sobre os quais se fixa o anticorpo monoclonal 44.

Exemplo 15: Seroneutralização cruzada *in vitro*

Foram efectuados testes de seroneutralização cruzada entre 18 isolados de terreno obtidos por zaragatoas faríngeas praticadas em gatos que apresentavam sinais de calicivirose felina. 7 têm por origem geográfica a França, trata-se dos isolados identificados A2, F3031, G1, G3, F1, H3-2 e H1-4. 4 têm por origem geográfica a Grã-Bretanha, trata-se dos isolados identificados J5, 337, 388b e 431. Finalmente, 7 têm por origem geográfica os EUA, trata-se dos isolados identificados RMI1, RMI2, RMI3, RMI5, RMI6, RMI7 e RMI9.

Para cada vírus FCV, foi produzido um anti-soro por inoculação de gatos pela via oronasal com 106,0 DICC₅₀ do vírus FCV testado. Os gatos isentos de patogénicos específicos (EOPS) tinham uma idade de 10 a 14 semanas.

O soro de cada animal foi recolhido um mês após a infecção. Os soros foram inactivados pelo calor (30 minutos a 56° C), repartidos, em fracções e armazenados a -20° C.

O soro obtido para cada isolado foi testado pela sua aptidão para neutralizar os 18 isolados. Os soros foram diluídos em cascata em terços com meio DMEM em placas a 96 poços para cultura celular. A 0,05 mL do soro diluído adicionou-se 0,05 mL de meio de cultura contendo aproximadamente 100 DICC₅₀ da estirpe viral seleccionada. Esta mistura foi incubada durante 2 horas a 37° C em estufa em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Foi a seguir adicionado a cada mistura 0,15 mL de uma suspensão de células CRFK contendo cerca de 100 000 células por mL. O efeito citopático foi observado por microscopia de contraste de fase após de 4 dias de cultura a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Os títulos neutralizantes de cada soro foram calculados de acordo com o método de Kärber. Os títulos são dados sob a forma da diluição mais importante que inibe o efeito citopático para 50% das cúpulas. Os títulos são expressos em log₁₀. O título mínimo assim encontrado foi de 0,7 log₁₀ de VN₅₀. Cada soro foi titulado pelo menos, duas vezes, de preferência três vezes.

A Figura 9 dá o conjunto dos titulados neutralizantes obtidos ao longo das seroneutralizações cruzadas efectuadas entre estas 18 estirpes de FCV e estes 18 soros.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Merial

<120> Genes de calicivírus felino e vacina recombinada que os contém

<130> FCV recombinado

<140>

<141> 2000-02-11

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 1

ttggcgccgc tggatgtgt tccaagttg agc 33

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 2

ttggcgccgy tggccmagtg cagcyrtrc caatc 36

<210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 3

ttggcgccaa ywgrtlwgh tacagtrca acyarcc 38

<210> 4

<211> 2010

<212> ADN

<213> calicivírus felino

<400> 4

```

atgtggtctca  cctcggctaa  ctggtctaaa  tccctatgatt  gggatccccca  cacaaaatttg  60
gtttattgacc  ccaataaact  cttttctctca  ggtctcttccg  ataaaccggct  tttatgctgc  120
taccrcagaaa  tttctccagc  atcttggaaca  gctgtgggact  gtagcccaatc  cctctctaca  180
atcttaccctg  aacctatctt  tggctgatgat  gaaatgggagc  cgacatttga  tgcttatcgt  240
cctggtctctc  cttccatctca  ctgggacaaag  gcttgggaaaa  ccttccagcc  tcatctcggg  300
gttctaaatgc  acccctctcat  caatgaagtc  gcaaaaagctt  gggatccaaa  tctcccctac  360
ttccgatctgg  aagctgacgg  ggaattcatcc  atcacgacccc  ctgagcaagg  aacattgggc  420
ggctgggtgct  ttgctcgagc  cagcgtctca  atggcaactg  ctgctgacgc  agcaactggc  480
aagaggtgctg  acccggcaatg  ggggtctcttc  ttctcattcc  atactagctg  gaattggagt  540
acatctgaaa  cccagggaaa  gatctctctt  aaaaatctt  taggacctct  acttaactct  600
tacctgaaac  accctctca  acatagctt  gcttgggtctg  gatcagtgga  tgtaaaggtc  660
ctattctctg  gctcgggtgt  cttcgggggg  aatttggctg  cctattgtgt  gctctcaggg  720
gttgacctcgg  tccagagcac  gtcattgctc  cagtatcccc  agtctctct  tgatgctctg  780
caagrtgaa  ctgttatatt  ttcaatcccc  gatttaagga  gcactctct  tcaacctaatg  840
tctgatactg  atactacatc  cctcgttctc  atggatata  atgattctat  taacctctat  900
gctaaatgat  ccaactcttc  tgggtgtatt  gttacccttg  agaccsaacc  tggacctgac  960
ttcaaatctc  acctctcga  accccccga  tcaatgttaa  ctcatggctc  tactcctct  1020
gacttgattc  caaatcttc  atctctctgg  attggaaatc  gatattggtc  tgacataact  1080
gatcttctaa  ttccggcact  cgtgtttcaa  gccaatctgc  acttfgactt  caaccaaga  1140
acggctggat  gggagcacacc  aagatctcga  cccataacea  caactattag  tgaagtaat  1200
ggatcaaaac  tgggaactgg  cgtggccaca  gattacartg  tgccccgat  acctgatggt  1260
tggcctgaca  ccacaartgg  tgaggaaatg  accccagctg  gagartactc  aatcacaaac  1320
ggttagtggca  atgacattgc  aacagctaat  gcttatgaca  gctgctgatg  gatcacaaac  1380
accacaaact  tccgggggat  ctacatttgt  ggagcactcc  agaggctctg  gggcgataag  1440
aagatctcaa  gtacagcttt  cataaccact  gctattaagg  aaggtaatac  gcttaaaaca  1500
tcaaatcaaa  ttgacatgac  aaaaattgct  gtgtaccagg  acactcatgt  tggcagggat  1560
gttcaaaact  ctgatgatac  accggcaatc  ctgggttaca  cgggaattgg  tgaacaggca  1620
attggatctc  atagggatag  tgggttctgc  atragctatg  tggcggaaac  tggtgccccg  1680
ggcgggaatc  acccaatttt  ccaaaaaat  tctatthaag  taggatatgt  acctcaggtc  1740
actgatgctg  tcaactcaac  aattctccac  acatctagac  aactgtccct  caatcattac  1800
ttgctaccac  ctgactcat  tgetgtttat  aggattatag  actctaattg  atcttgggtt  1860
gatgtaggga  ttgatagtga  tggtrtttcc  ttgttgggg  tctctagtat  ccccaaaact  1920
gagtttctc  tttctgctc  ctacatggga  attcagctgg  caaagattcg  acttgcctct  1980
aacatragga  gtaactatga  aaaaactatga  2010

```

- <210> 5
- <211> 669
- <212> PRT
- <213> calicivirus felino
- <400> 5

Met	Cys	Ser	Thr	Cys	Ala	Asn	Val	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Asp	Trp	Asp	Pro
1				5					10					15	
His	Thr	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Pro	Asn	Lys	Phe	Leu	Ser	Leu	Gly	Phe
			20					25					30		
Cys	Asp	Lys	Pro	Leu	Leu	Cys	Cys	Tyr	Pro	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Phe
		35					40						45		
Gly	Thr	Val	Trp	Asp	Cys	Asp	Gln	Ser	Pro	Leu	Gln	Ile	Tyr	Leu	Glu
	50					55					60				
Ser	Ile	Leu	Gly	Asp	Asp	Glu	Trp	Ser	Ser	Thr	Phe	Asp	Ala	Ile	Asp
65					70					75					80
Pro	Val	Val	Pro	Pro	Met	His	Trp	Asp	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Phe	Gln
					85				90					95	
Pro	His	Pro	Gly	Val	Leu	Met	His	His	Leu	Ile	Asn	Glu	Val	Ala	Lys
				100				105					110		

Ala Trp Asp Pro Asn Leu Pro Ile Phe Arg Leu Glu Ala Asp Gly Asp
 115 120 125
 Ser Ser Ile Thr Thr Pro Glu Gln Gly Thr Leu Val Gly Gly Val Ile
 130 135 140
 Ala Glu Pro Ser Ala Gln Met Ala Thr Ala Ala Asp Ala Ala Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Val Asp Ser Glu Trp Glu Ser Phe Phe Ser Phe His Thr Ser
 165 170 175
 Val Asn Trp Ser Thr Ser Glu Thr Gln Gly Lys Ile Leu Phe Lys Gln
 180 185 190
 Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Leu Glu His Leu Ser Lys Leu
 195 200 205
 Tyr Val Ala Trp Ser Gly Ser Val Asp Val Arg Phe Ser Ile Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Val Phe Gly Gly Lys Leu Ala Ala Ile Val Val Pro Pro Gly
 225 230 235 240
 Val Asp Pro Val Gln Ser Thr Ser Met Leu Gln Tyr Pro His Val Leu
 245 250 255
 Phe Asp Ala Arg Gln Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Ile Pro Asp Leu
 260 265 270
 Arg Ser Thr Leu Tyr His Leu Met Ser Asp Thr Asp Thr Thr Ser Leu
 275 280 285
 Val Ile Met Val Tyr Asn Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Ala Asn Asp Ser
 290 295 300
 Asn Ser Ser Gly Cys Ile Val Thr Val Glu Thr Lys Pro Gly Pro Asp
 305 310 315 320
 Phe Lys Phe His Leu Leu Lys Pro Pro Gly Ser Met Leu Thr His Gly
 325 330 335
 Ser Ile Pro Ser Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ser Ser Leu Trp Ile Gly
 340 345 350
 Asn Arg Tyr Trp Ser Asp Ile Thr Asp Phe Val Ile Arg Pro Phe Val
 355 360 365
 Phe Gln Ala Asn Arg His Phe Asp Phe Asn Gln Glu Thr Ala Gly Trp
 370 375 380
 Ser Thr Pro Arg Phe Arg Pro Ile Thr Ile Thr Ile Ser Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Ser Lys Leu Gly Thr Gly Val Ala Thr Asp Tyr Ile Val Pro Gly
 405 410 415
 Ile Pro Asp Gly Trp Pro Asp Thr Thr Ile Gly Glu Glu Leu Thr Pro
 420 425 430

Ala Gly Asp Tyr Ser Ile Thr Asn Gly Ser Gly Asn Asp Ile Ala Thr
435 440 445

Ala Asn Ala Tyr Asp Ser Ala Asp Val Ile Thr Asn Thr Thr Asn Phe
450 455 460

Arg Gly Met Tyr Ile Cys Gly Ala Leu Gln Arg Ala Trp Gly Asp Lys
465 470 475 480

Lys Ile Ser Ser Thr Ala Phe Ile Thr Thr Ala Ile Lys Glu Gly Asn
485 490 495

Thr Leu Lys Pro Ser Asn Thr Ile Asp Met Thr Lys Ile Ala Val Tyr
500 505 510

Gln Asp Thr His Val Gly Arg Asp Val Gln Thr Ser Asp Asp Thr Leu
515 520 525

Ala Ile Leu Gly Tyr Thr Gly Ile Gly Glu Gln Ala Ile Gly Ser Asn
530 535 540

Arg Asp Ser Val Val Arg Ile Ser Met Leu Pro Glu Thr Gly Ala Arg
545 550 555 560

Gly Gly Asn His Pro Ile Phe Tyr Lys Asn Ser Ile Lys Leu Gly Tyr
565 570 575

Val Leu Arg Ser Ile Asp Val Phe Asn Ser Gln Ile Leu His Thr Ser
580 585 590

Arg Gln Leu Ser Leu Asn His Tyr Leu Leu Pro Pro Asp Ser Phe Ala
595 600 605

Val Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Asn Gly Ser Trp Phe Asp Val Gly Ile
610 615 620

Asp Ser Asp Gly Phe Ser Phe Val Gly Val Ser Ser Ile Pro Lys Leu
625 630 635 640

Glu Phe Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Met Gly Ile Gln Leu Ala Lys Ile
645 650 655

Arg Leu Ala Ser Asn Ile Arg Ser Thr Met Thr Lys Leu
660 665

<210> 6
<211> 2007
<212> ADN
<213> calicivirus felino
<400> 6

```

#ctgtgctcaa cctggegctaa egggcttaaa tactatgatt gggatcccca ctttagattg 60
attattraacc ccaacaaaat tctttccggt ggcttctgtg ataatccctc tatgtgttgt 120
tatcccgant tactccctga atttggaact gtgtgggact gtgatcagtc accactccaa 180
atztatctag agtccatcct tgggtgatgac gaatgggctt ccacttaccg agcagctgac 240
ccagtgggag caccaaatga ttgggatagc gctggaaga tctttcagcc acatcctggt 300
gtattgargc accatctgat tggtagagct gctaaaggct gggatcccaa cttaccctc 360
tttcgctcgg aagcgggatga tggatctctg accatcgctg aacaagggaac actgggtcgt 420

```

```

ggagctcattg ctgagcctaa tccccaaatg tcagctgttg ctgacgtggc cactggcaaa 480
agtgctgact ctgagtgagg agcattcttc tctttccaca ccagtgtcaa ttggagcaca 540
tctgaaaacc aagggaaaat cctcttcaa caatctctag gtccccact taaccctac 600
cttaccctatc tgcabaaact ttatgttga tggctctggt ctattgaggt tagattttca 660
acttcaggat ctggctctt tgggtgaaaa ctggttctta ttgttctgct acccgggac 720
gatcccgctg aaagcacatc aatgttgcag taccctcatg tctgttctga tgcctgctca 780
gtgaaacctg ttatcttccac tatccctgat ttgagaaata gtctatatca ccttatgtct 840
gacacagata ctatctctc tgtcattatg atatacaatg atctcattaa tccctatgct 900
aatgatctca actcatctgg atgcattgtt actgtggaga caaaacctg ccccgatttc 960
aaattccacc tcttgaaaac gcttgggtct atgctaacct atgggtcaat tccatccgac 1020
cttatcccaa aatctctctc tctttggatt ggcaaccgac actggtctga tataactgat 1080
tttgtctatca aacctctgt tttccaggct aatcgacat ttgacttcaa tcaagagact 1140
gcagcctggg gcactcccag atttagacc ataaccaata cagtttctga gaagggagga 1200
tcaaaattgg gtattgggtg tgcactgac tctattgtcc ctggcatacc agacggctgg 1260
ccgataccca ccatccaga aaaaattanc ccagcaggtg actatgcaat caaaaactgg 1320
ggaaacaaatg acatcaccac tgcctgggac tatgatgggg caagtataat caaaaactat 1380
acaaatttca aggtatgta tatttgtggt gctttgcaaa gagcttgggg tgcagaagaa 1440
atftcaaaac ctgctcttat cactaccgca atcagagagg gtaactcaat aaaaactatc 1500
aatgtaattg acatgacaaa acttgcctgt tatcaagatg ctcatgttgg tgcagaactc 1560
caaacctctg acatcaccct agcaatcctt ggttataccg ggatgggtga agaagctata 1620
ggccttgata gggacaaagt ggtgcgtatt agcatacttc cagaaactgg tgcctgctgg 1680
ggaaatcacc ctatcttcta tatgaaacaa attaaatagg gttatgttat tagatcaata 1740
gatgtggaaa actcccaaat ttacatata tctaggcaat tatcactcaa taattatcta 1800
ctggctcttg actcttctgc agtttaccaga atcattgatc ctggcggctc ttggtttgat 1860
attggtattg atagtgatgg tttctctttt gttggtgtat ctcaaatcgg aaaattggag 1920
tttccactaa ctgctccta catgggaatt caactggcaa agatccgact tgcctcaaac 1980
attagcagtg gaatggtaa aatatga 2007

```

<210> 7

<211> 668

<212> PRT

<213> calicivirus felino

<400> 7

Met Cys Ser Thr Cys Ala Asn Val Leu Lys Tyr Tyr Asp Trp Asp Pro
 1 5 10 15
 His Phe Arg Leu Ile Ile Asn Pro Asn Lys Phe Leu Ser Val Gly Phe
 20 25 30
 Cys Asp Asn Pro Leu Met Cys Cys Tyr Pro Glu Leu Leu Pro Glu Phe
 35 40 45
 Gly Thr Val Trp Asp Cys Asp Gln Ser Pro Leu Gln Ile Tyr Leu Glu
 50 55 60
 Ser Ile Leu Gly Asp Asp Glu Trp Ala Ser Thr Tyr Glu Ala Val Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Val Pro Pro Met His Trp Asp Ser Ala Gly Lys Ile Phe Gln
 85 90 95
 Pro His Pro Gly Val Leu Met His His Leu Ile Gly Glu Val Ala Lys
 100 105 110
 Ala Trp Asp Pro Asn Leu Pro Leu Phe Arg Leu Glu Ala Asp Asp Gly
 115 120 125
 Ser Val Thr Thr Pro Glu Gln Gly Thr Leu Val Gly Gly Val Ile Ala
 130 135 140

Glu Pro Asn Ala Gln Met Ser Ala Val Ala Asp Val Ala Thr Gly Lys
 145 150 155 160
 Ser Val Asp Ser Glu Trp Glu Ala Phe Phe Ser Phe His Thr Ser Val
 165 170 175
 Asn Trp Ser Thr Ser Glu Thr Gln Gly Lys Ile Leu Phe Lys Gln Ser
 180 185 190
 Leu Gly Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Leu Thr His Leu Ala Lys Leu Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Ser Gly Ser Ile Glu Val Arg Phe Ser Ile Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Val Phe Gly Gly Lys Leu Ala Ala Ile Val Val Pro Pro Gly Ile
 225 230 235 240
 Asp Pro Val Gln Ser Thr Ser Met Leu Gln Tyr Pro His Val Leu Phe
 245 250 255
 Asp Ala Arg Gln Val Glu Pro Val Ile Phe Thr Ile Pro Asp Leu Arg
 260 265 270
 Asn Ser Leu Tyr His Leu Met Ser Asp Thr Asp Thr Thr Ser Leu Val
 275 280 285
 Ile Met Ile Tyr Asn Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Ala Asn Asp Ser Asn
 290 295 300
 Ser Ser Gly Cys Ile Val Thr Val Glu Thr Lys Pro Gly Pro Asp Phe
 305 310 315 320
 Lys Phe His Leu Leu Lys Pro Pro Gly Ser Met Leu Thr His Gly Ser
 325 330 335
 Ile Pro Ser Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ser Ser Leu Trp Ile Gly Asn
 340 345 350
 Arg His Trp Ser Asp Ile Thr Asp Phe Val Ile Lys Pro Phe Val Phe
 355 360 365
 Gln Ala Asn Arg His Phe Asp Phe Asn Gln Glu Thr Ala Gly Trp Ser
 370 375 380
 Thr Pro Arg Phe Arg Pro Ile Thr Ile Thr Val Ser Glu Lys Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Lys Leu Gly Ile Gly Val Ala Thr Asp Ser Ile Val Pro Gly Ile
 405 410 415
 Pro Asp Gly Trp Pro Asp Thr Thr Ile Pro Glu Lys Leu Thr Pro Ala
 420 425 430
 Gly Asp Tyr Ala Ile Thr Asn Gly Gly Asn Asn Asp Ile Thr Thr Ala
 435 440 445
 Ala Asp Tyr Asp Gly Ala Ser Ile Ile Lys Asn Asn Thr Asn Phe Lys
 450 455 460

Gly Met Tyr Ile Cys Gly Ala Leu Gln Arg Ala Trp Gly Asp Lys Lys
 465 470 475 480
 Ile Ser Asn Thr Ala Phe Ile Thr Thr Ala Ile Arg Glu Gly Asn Ser
 485 490 495
 Ile Lys Pro Ser Asn Val Ile Asp Met Thr Lys Leu Ala Val Tyr Gln
 500 505 510
 Asp Ala His Val Gly Ala Glu Leu Gln Thr Ser Asp Ile Thr Leu Ala
 515 520 525
 Ile Leu Gly Tyr Thr Gly Ile Gly Glu Glu Ala Ile Gly Leu Asp Arg
 530 535 540
 Asp Lys Val Val Arg Ile Ser Ile Leu Pro Glu Thr Gly Ala Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Asn His Pro Ile Phe Tyr Met Asn Lys Ile Lys Leu Gly Tyr Val
 565 570 575
 Ile Arg Ser Ile Asp Val Ala Asn Ser Gln Ile Leu His Thr Ser Arg
 580 585 590
 Gln Leu Ser Leu Asn Asn Tyr Leu Leu Ala Pro Asp Ser Phe Ala Val
 595 600 605
 Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Gly Gly Ser Trp Phe Asp Ile Gly Ile Asp
 610 615 620
 Ser Asp Gly Phe Ser Phe Val Gly Val Ser Gln Ile Gly Lys Leu Glu
 625 630 635 640
 Phe Pro Leu Thr Ala Ser Tyr Met Gly Ile Gln Leu Ala Lys Ile Arg
 645 650 655
 Leu Ala Ser Asn Ile Arg Ser Gly Met Val Lys Ile
 660 665

<210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido
 <400> 8
 aaacgcctcg acatgtgctc aacctgcgct aacgtg 36

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido
 <400> 9

tttgyatc tcatatitta accatccac tcc 33

- <210> 10
- <211> 3701
- <212> ADN
- <213> virus da variola dos canários

<400> 10

```

aagcttctat caaaagctct atgagtttag gtgtagatag catagatatt acacaaaagg 60
tattcatatt cccatcaaat tctaaagtag atgarattaa caactcaaaag argatgatag 120
tagataatag aacggcccat ataatgactg caaatrtggg cggttcacac tttaatccatc 180
acggcttcat aagrrtcaac tgcatagatt aaaaatctcac taaaaagata gccgatgtat 240
ttgagagaga ttggacatct aactacgcta aagaaaattac agttatcaaa aaracataatc 300
ggatcttctc atctatcaggt atatttcaac taagtacaaat aaaaagttat aaataaaaaat 360
acttaacttac gaaaaaatgt catrtttaca aaaaactcat ttacacagaa aatrttatagt 420
agagrrcttc aagagrtata atttcaaaag taacctcaat gtaataatta ccaactcaga 480
tgatgatatt ctgttagtaa taatgtaaga taatgtactg ttatctacaa gattattatc 540
atrtgataaa actctgtttt tcaactcctt taataacggg ttatcaaaaat acgaaactat 600
tagtgataca aatrtagata tagataacca taactattat atacctaggt ctctctcttc 660
gttagatatt ctaaaaaaa gagcgtgtga tttagaatta gaagatctaa arctatgggt 720
aataggagac aatagtaact tatatttata agatartgact tacatgaata atctggctat 780
tactaaagga taatrtagatt acaagtttgt attatrtggc gatgtagata aatgtttaca 840
acagtataat aaaaagtaata ctataataga tataatacat cggatcaaca gacagtataa 900
catatgggtt aaaaangtta tagaatactg ttctctctggc tatatattat ggttacatga 960
tctaaaagcc ctctctgaag atgatttgtt aagatacagat aacctataa aagaattatc 1020
tggggataaa ctatcaactt tggagttcat agttatatta gaaaataata taaaacattt 1080
acagataggt acaataaattg tacatccaaa caagataata gctaatggta catctataaa 1140
tataactact gattttctat cttaacgtaga agaactaata tatcatcaca atccatctat 1200
aatattggcc gpatatcttt tagaattctt tgagaccact attttatcag aatrtatttc 1260
ttcatctctt gaatgggtca tgaatagtaa ctgttttagt cacctgaaaa cagggtatga 1320
agctatactc tttagatgta gttttttttt ccaactctct actaaaagca atttatgaaa 1380
atattggaca aagaaaactt cgcagtataa gaactttttt aaagacggtt aacagttagc 1440
aaaatatata artaagaaag atagtcaggt gatagataga gtatgttat tacacgcagc 1500
tgtatataat cagtraactt acttaatgga tacgtttaaa atctctggt ttgatttcaa 1560
atrtctagga atgatagata tactactggt tgaatatrtg ctaaggata atgagaatat 1620
atrtctctcg aacgggtgtt ctgtaactaa tataatata gaatctatct atgcagattt 1680
ttactttata tcaagatgta ataaatctag caaaaagata gpatataaaa ctatgtttcc 1740
tatactctga gaaaaactat atcaaaaagg aaggrrctat ttacacata catctaacga 1800
agatctctcg ctatctgtt tatgcaaggt aacagtrtgt aaagatataa aaatctcatt 1860
attatattct aaaaaggata tctcagcaaa acgactcata ggtttattta catctgtcga 1920
tataaatcag gctgtrtagt taagaggata taanaataaga gtaataggat gtttagaatg 1980
gcttgaaaag atcaaaaatat tcaattctaa tcttaccatc attagattat tactaacaga 2040
aagactttta gatattctac atctctatct gtttaaatrt aatataacag aggatataga 2100
taccagagac gtagtcagaa ataatttacc tataatrtct tttatctgca gttattgtag 2160
atcgtatctc tcaaaactac taatrtgca tatgtacaat tctgttaaga taacaaagt 2220
taaatataat caggtaatat ataatctcat ataggagtat atataattga aaaaagtaaaa 2280
tataaatcat ataaatagta aacgaaarat cagtaataga caggaaactgg cagattcttc 2340
ttcaatgaa gtaagtaactg ctaaatctcc aaaaatragat aaaaatgata cagcaaatac 2400
agcttcatc aacgaattac cttrcaattt tttcagacac accttattac aaactaacta 2460
agtcagatga tgaagaaata aatataaatt taacctatgg gtataatata ataaagattc 2520
atgatatcaa taatttactt aacgatgta atagacttat tccatcaacc ccttcaaaac 2580
ttctgggata ttatcaaaata ccagttaatg atattaaaaat agattgttta agagatgtaa 2640
ataattattt ggaagtaaaag gatataaaaat tagtctatct tctacatgga aatgaattac 2700
ctaatttaa caattatggt aggaattttt taggatctac agctgttata tgtatcaaca 2760
atacaggcag atctatgggt atggtaaaaa actgtaacgg gaagcagcat tctatgtaa 2820
ctggcctatg ttaaaagcc agatcatttt actctataaa caatataaa caaataatag 2880
gatctcttag a:atttaata tctacttaa caacaacaaa aaaaatcaac gatgtatggc 2940

```

```

cggagagtcctt  tttctctcacc  aagagagagag  atagctctacc  tttctctcacc  gactatgaaag  3000
aagatcaatcca  ccttagctagca  gttaccacacc  cggagagagag  cggatctcacc  aacgctggag  3060
ctctctctctc  aactagcctca  ttacttagag  atctcaaaacc  cagactcagc  atcaacaaac  3120
agctcaaaarg  caatctcagc  tctctctctc  atctcaaaacc  tagctcctca  atnagctgata  3180
tactgaaagcg  atctcaaaarg  tcaactctctc  aaggaatagc  caatctcagc  atctctctca  3240
atctctctc  cttagaactc  aacgctctca  ccaactcacc  aatagggata  cgtgctaggc  3300
cgtcaaaagc  cgtcaaaagc  agtaagagctg  tagaaagaaac  accctgctct  atctctctca  3360
aggaagagagc  cttagaactc  cttagaactc  atctcaaaarg  ctctctctca  cactctcaaa  3420
aaatctctctc  agctcaaaarg  aaggaatagc  atctcaaaarg  cgttagctca  gaactctctc  3480
atctctctc  ctctctctc  ctctctctc  aaggaatagc  atctcaaaarg  ctctctctca  3540
cctctctctc  taggaatctc  aatctctctc  aatctctctc  atctctctc  ggggggctag  3600
aggaatctctc  aatctctctc  atctctctc  taatctctc  aaggaatctc  aatctctctc  3660
ttctctctc  ctctctctc  aatctctctc  ttctctctc  a  3701

```

<210> 11

<211> 42

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 11

atcactcagc tgggggccc ctatcaaaag tctaatgag tt 42

<210> 12

<211> 73

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 12

gaattctctc agctcagcc cgggtctctc tagctcctca gtcattctct cgtcaagtaag 60
ctctctctct caa 73

<210> 13

<211> 72

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 13

ccccggctgc agctcagggc atctctctca ctgactcctc agctcaaatca gctatctctca 60
ctgaaagagc aa 72

<210> 14

<211> 45

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 14

gaigatggta ccttcataaaa tacaagtttg ataaactta agtg 45

<210> 15

<211> 34

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 15

aaaccgggt tctttattct atacttaaaa agtg 34

<210> 16

<211> 43

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 16

aaaagaattc gtcgactacg atacaaactt aacggatgc ggc 43

<210> 17

<211> 55

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 17

aaatcgcat atccgttaag ttgtatcgt aaigtgctca acctgogcta accg 55

<210> 18

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 18

ttgtcgac tcatattta accattccac tcc 33

<210> 19

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 19

tttgcgac tcatagttt gtcatagtac tcc 33

<210> 20

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 20

tatggggcgg ccaccatgtg gctgcagaac ctg 33

<210> 21

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 21

tatggggcgg ctacgtatca ctcttgact ggttc 36

<210> 22

<211> 432

<212> ADN

<213> *Felis catus*

<400> 22

```

atgtggcngc agaaccctget tttectgggc actgtgggtc gcageatctc tgcacccacc 60
agttcaccca gctctgtgac tgggeccctgg caacacgggg atgcccacaa ggaggctctg 120
agccttctga acaacagtag tgaataaact gctgtgatga atgaagcagt agaagtcgtc 180
tctgaaatgt ttgaccctga ggagccgaaa tgcctgcaga ctcacctaaa gctgtacgag 240
cagggcctac ggggcagcct cctcagcctc aaggagcctc tgagaatgat gcccaccat 300
tacaagcagc actgcccctt tactccggaa acgcccctgt aaacccagac tatcaccttc 360
aaaaattcca aagagaatct gaaggatttt ctgttttaaca tcccctttga ctgctggaaa 420
ccagtcaga# ag 432

```

<210> 23

<211> 432

<212> ADN

<213> *Felis catus*

<400> 23

atgtggcngc agaaccctget tttectgggc actgtgggtc gcageatctc tgcacccacc 60

REIVINDICAÇÕES

1. Fragmento de ácido nucleico compreendendo a sequência nucleotídica representada pela SEQ ID NO:6.

2. Fragmento de ácido nucleico da sequência nucleotídica representada pela SEQ ID NO:6 que codifica para um epitopo, péptido ou polipéptido, sendo o referido epitopo, péptido ou polipéptido capaz de induzir *in vivo* no gato anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

3. Fragmento de ácido nucleico que codifica para a proteína da cápside representada pela SEQ ID NO: 7.

4. Fragmento de ácido nucleico que codifica para um fragmento imunologicamente activo da proteína da cápside representada pela SEQ ID NO: 7, sendo o referido fragmento imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo* no gato anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

5. Fragmento de ácido nucleico que codifica para a proteína da cápside de um calicivírus felino (FCV) reconhecido pelo anticorpo monoclonal 44 segregado pelo hibridoma depositado na CNCM sob o número de acesso I-2282,

sendo a referida proteína da cápside capaz de induzir *in vivo* no gato anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

6. Fragmento de ácido nucleico que codifica para um fragmento imunologicamente activo da proteína da cápside de um calicivírus felino (FCV) reconhecido pelo anticorpo monoclonal 44 segregado pelo hibridoma depositado na CNCM sob o número de acesso 1-2282, o referido fragmento imunologicamente activo.

7. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* compreendendo um fragmento de ácido nucleico de acordo com uma das reivindicações 1 a 6.

8. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com a reivindicação 7, na qual o fragmento de ácido nucleico está sob a dependência de sinais reguladores da transcrição.

9. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com a reivindicação 7 ou 8, seleccionado a partir do grupo constituído por vírus da varíola, adenovírus, herpesvírus e baculovírus.

10. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com a reivindicação 7 ou 8, sendo o vector de expressão um plasmídeo.

11. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, que compreende, adicionalmente, um fragmento de ácido nucleico compreendendo toda ou parte da sequência nucleotídica representada pela SEQ ID NO: 4.

12. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, que compreende um fragmento de ácido nucleico adicional, compreendendo o fragmento de ácido nucleico adicional a sequência nucleotídica representada pela SEQ ID NO: 4.

13. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, que compreende um fragmento de ácido nucleico adicional, compreendendo o fragmento de ácido nucleico adicional um fragmento da sequência nucleotídica representada pela SEQ ID NO: 4 que codifica para um epitopo, péptido ou polipéptido capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV G1 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2167.

14. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, que compreende um fragmento de ácido nucleico adicional, o fragmento de ácido nucleico adicional que codifica para a proteína da cápside representada pela SEQ ID NO: 5.

15. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, que compreende um fragmento de ácido nucleico adicional, o fragmento de ácido nucleico adicional que codifica para um fragmento imunologicamente activo da proteína da cápside representada pela SEQ ID NO: 5, sendo o referido fragmento imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV G1 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2167.

16. Vector de expressão *in vivo* ou *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, na qual o fragmento de ácido nucleico está sob a dependência de sinais reguladores da transcrição.

17. Vector de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 16, compreendendo adicionalmente uma sequência nucleotídica de um imunogénico de um outro patogénico felino.

18. Vector de expressão de acordo com a reivindicação 17, no qual o outro patogénico felino é seleccionado a partir do grupo consistindo no vírus da rinotraqueíte felina (também denominado herpesvírus felino, FHV), o vírus da leucemia felina (FeLV), o parvovírus felino (FPV), o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), o

vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da raiva, *Chlamydia*.

19. Preparação imunogénica ou vacina contra a calicivirose felina, compreendendo um vector de expressão *in vivo* de acordo com uma das reivindicações 7 a 18, e um veículo ou excipiente aceitável no plano veterinário.

20. Preparação imunogénica ou vacina contra a calicivirose felina e contra pelo menos, um outro patogénico felino, compreendendo um primeiro vector de expressão *in vivo* de acordo com uma das reivindicações 7 a 18 e um segundo vector de expressão *in vivo* no qual é inserida uma sequência que codifica para um imunogénico de um outro patogénico felino.

21. Preparação imunogénica ou vacina multivalente contra a calicivirose felina e contra, pelo menos, um outro patogénico felino, compreendendo um vector de expressão *in vivo* de acordo com a reivindicação 17 ou 18, e um veículo ou excipiente aceitável no plano veterinário.

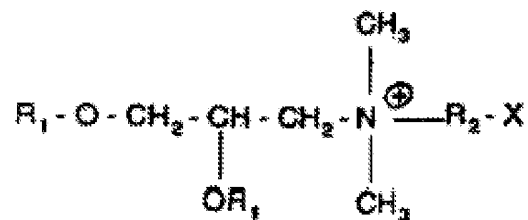
22. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, na qual, pelo menos um dos vectores de expressão *in vivo* é um vírus de varíola.

23. Preparação imunogénica ou vacina de acordo

com a reivindicação 22, na qual o vírus da varíola é um vírus da varíola dos canários.

24. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, compreendendo adicionalmente um adjuvante.

25. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 24, na qual pelo menos um dos vectores de expressão *in vivo* é um plasmídeo e o adjuvante é um lípido catiónico contendo um sal de amónio quaternário, de fórmula:



na qual R₁ é um radical alifático linear, saturado ou insaturado, possuindo de 12 a 18 átomos de carbono, R₂ é um outro radical alifático, contendo 2 ou 3 átomos de carbono, e X um agrupamento hidroxilo ou amina.

26. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 25, na qual o adjuvante é o DMRIE.

27. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com uma ou outra das reivindicações 25 e 26, na qual o adjuvante é acoplado com um lípido neutro.

28. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 27, na qual o lípido neutro compreende o DOPE.

29. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 27, na qual o adjuvante compreende o DMRIE-DOPE.

30. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 22 ou 23, que compreende adicionalmente um adjuvante compreendendo um polímero de ácido acrílico ou metacrílico.

31. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 24, na qual o adjuvante compreende um carbómero.

32. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 31, compreendendo adicionalmente um vector plasmídico de expressão *in vivo*, na qual é inserido o gene que codifica para o GM-CSF felino.

33. Preparação imunogénica ou vacina contra a calicivirose felina compreendendo a proteína da cápside da estirpe FCV 431 montada sob forma de cápsides vazias, possuindo esta proteína a sequência SEQ ID NO:7.

34. Preparação imunogénica ou vacina contra a calicivirose felina compreendendo um fragmento ou epitopo imunologicamente activo da sequência SEQ ID NO:7, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

35. Preparação imunogénica ou vacina contra a calicivirose felina, compreendendo a proteína da cápside de um calicivírus felino reconhecido pelo anticorpo monoclonal 44, montada sob forma de cápsides vazias.

36. Preparação imunogénica ou vacina contra a calicivirose felina, compreendendo um fragmento ou epitopo imunologicamente activo da proteína da cápside de um calicivírus felino reconhecido pelo anticorpo monoclonal 44, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

37. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 36, compreendendo adicionalmente a proteína da cápside da estirpe FCV G1 montada sob forma de cápsides vazias, possuindo esta proteína a sequência SEQ ID NO: 5.

38. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 36, compreendendo adicionalmente um fragmento ou epitopo imunologicamente activo da proteína possuindo a sequência SEQ ID NO: 5, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV G1 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2167.

39. Proteína da cápside isolada, purificada ou sintética, possuindo a sequência SEQ ID NO: 7 montada sob forma de cápsides vazias.

40. Fragmento ou epitopo imunologicamente activo da proteína possuindo a sequência SEQ ID NO: 7, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

41. Proteína da cápside isolada, purificada ou sintética, de um calicivírus felino reconhecido pelo anticorpo monoclonal 44, montada sob forma de cápsides vazias, sendo a referida proteína da cápside capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro

de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

42. Fragmento ou epitopo imunologicamente activo da proteína da cápside isolada, purificada ou sintética, de um calicivírus felino reconhecido pelo anticorpo monoclonal 44, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV 431 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2166.

43. Preparação imunogénica ou vacina, compreendendo uma proteína da cápside isolada, purificada ou sintética ou fragmento ou epitopo imunologicamente activo de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 42, e um veículo ou excipiente aceitável no plano veterinário.

44. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 43, compreendendo adicionalmente um imunogénico de um outro patogénico felino ou um vector de expressão compreendendo uma sequência nucleotídica de um imunogénico de um outro patogénico felino.

45. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com a reivindicação 44, na qual o outro patogénico felino é seleccionado a partir do grupo consistindo no vírus da rinotraqueíte felina (também denominado herpesvírus felino,

FHV), o vírus da leucemia felina (FeLV), o parvovírus felino (FPV), o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da raiva, *Chlamydia*.

46. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, compreendendo adicionalmente a proteína da cápside isolada, purificada ou sintética, possuindo a sequência SEQ ID NO: 5.

47. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, compreendendo adicionalmente um fragmento ou epitopo imunologicamente activo da proteína possuindo a sequência SEQ ID NO: 5, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV G1 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2167.

48. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, compreendendo adicionalmente um vector de expressão compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica para a proteína possuindo a sequência SEQ ID NO: 5.

49. Preparação imunogénica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, compreendendo

adicionalmente um vector de expressão compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica para um fragmento ou epitopo imunologicamente activo da proteína possuindo a sequência SEQ ID NO: 5, sendo o referido fragmento ou epitopo imunologicamente activo capaz de induzir *in vivo*, no gato, anticorpos possuindo o espectro de neutralização cruzada do anti-soro da estirpe FCV G1 tal como depositada na CNCM sob o número de acesso I-2167.

Lisboa, 15 de Abril de 2008

Figura 1

1 ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTCCTTAAYTACTATGATTTGGGATCCCCACBCAAATTTGGTATTGACCCCAATAAA
1 MetCysSerThrCysAlaAsnValLeuLysTyrTyrAspTrpAspProHisThrLysLeuValIleAspProAsnLys
76 TTCCCTTCTCTAGGCTTCTCCGATAAACCCCTTTATGCTGCTACCCAGACTTCTCCCAATTTGGACACGTGTGG
27 PheLeuSerIleuGlyPheCysAspLysProLeuLeuCysCystTyrProGluLeuLeuProGluPheGlyThrValTrp
157 GATTGTACCAATCCCTCTACAAATTFACCTTGANTCTATCCTTGGTGATGATGAATGGAGCTCGACATTTGATGCT
53 AspCysAspGlnSerProLeuGlnIleTyrLeuGluSerIleLeuGlyAspAspGluTrpSerSerThrPheAspAla
235 ATCGATCCTGTTTCTCCATGCTTGGGACAGGCTGGGAARATCTCCAGCCTCATCTCGTGTCTTAATGCAC
79 IleAspProValValProProMetHisTrpAspLysAlaGlyLysIlePheGlnProHisProGlyValLeuMetHis
313 CACCTCATCAATGAAGTTGCABAAGCTTGGGATCCAAATCTCCCATCTTCCGATTGGAAAGCTGACGGGATTTCATCC
109 HisLeuIleAsnGluValAlaLysAlaTrpAspProAsnLeuFroIlePheArgLeuGluAlaAspGlyAspSerSer
391 ATCAGGACCCCTGAGCAAGGAACATTTGGTCCGGTGTATTGGCGAGCCAGCCGCTCAATGCCAATCTCTCTGAC
131 IleThrThrProGluGlnGlyThrLeuValGlyGlyValIleAlaGluProSerAlaGlnMetAlaThrAlaAlaAsp
469 GCAGCACTGCCAAGAGTGTGACTCCGAATGGAGTCTTTCTTCTCATTECCTACTAGTGTGAATTCGAGTACATCT
499 AlaAlaThrGlyLysSerValAspSerGluTrpGluSerPhePheSerPheHisThrSerValAsnTrpSerThrSer
547 GAAACCCAGGAAAGATCCTCTTTAAACAATCTTAGGACCCCTACTTATCTTACCTTGAACACCTTTCTAARATTA
183 GluThrGlnGlyLysIleLeuPheLysGlnSerLeuGlyProLeuLeuAsnProTyrLeuGluHisLeuSerLysLeu
625 TACCTTCTTGGTCTGGATCACTGGATGTAAGTTCCTATTTCTGGCTCCGGTGTCTTGGGGGGAATTTGGCTGGC
209 TyrValAlaTrpSerGlySerValAspValArgPheSerIleSerGlySerGlyValPheGlyGlyLysLeuAlaAla
703 ATTGTTGTGCTCCAGGGGTTGACCCCGTCCAGAGCAGCTCAATGCTCCAGTATCCCATGTCTCTTTGATGCTGGC
235 IleValValProProGlyValAspProValGlnSerThrSerMetLeuGlnTyrProHisValLeuPheAspAlaArg
761 CAAGTTCACCTGTTATATTTCAATCCCGATTTAAGGAGCAGCTCTCTATCAGCTATGCTGTGATCTACTACTACA
261 GlnValGluProValIlePheSerIleProAspLeuArgSerThrLeuTyrHisLeuMetSerAspThrAspThrThr
859 TCCCTTGTATCATGATATAATGATCTTATTACCTTATSCATATGATTCCAACTCTTCTGGGTGATTTGTTACC
267 SerLeuValIleMetValTyrAsnAspLeuIleAsnProTyrAlaAsnAspSerAsnSerSerGlyCysIleValThr
937 GTTAGACCCAAACCTGGAGCTGACTTCAATTTCACTTCTGAAACCACTGGATCAATGTTACTCATGGCTCTATT
313 ValGluThrLysProGlyProAspPheLysPheHisLeuLeuLysProProGlySerMetLeuThrHisGlySerIle
1015 CCCTCTEACTTGATTCCAAAATCTTCACTCCCTTTGGATTCGAAATTCGATATTGGTCTGACTAATGATTTGTAAAT
229 ProSerAspLeuIleProLysSerSerSerLeuTrpIleGlyAsnArgTyrTrpSerAspIleThrAspPheValIle
1093 CGCCATTCCTGTTTTCAAGCCATCGTCACTTTGACTTCAACCAAGAAACGGCTGGATGGAGCCACCCAGATTTCCA
365 ArgProPheValPheGlnAlaAsnArgHisPheAspPheAsnGlnGluThrAlaGlyTrpSerThrProArgPheArg
1171 CCCATACAACTAATATTAGTGAAGTAAATGATCAAAACTGGGACTGGCGTGGCCACAGATTACATTGTGCCCGCC
391 ProIleThrIleThrIleSerGluSerAsnGlySerLysLeuGlyThrGlyValAlaThrAspTyrIleValProGly
1249 ATACCTGCTGGTGGCGTGCACCCACAAATTTGGTGGGAAATTTGACCCAGCTGGAGATTACTCAATCACAAACGGTAGT
417 IleProAspGlyTrpProAspThrThrIleGlyGluGluLeuThrProAlaGlyAspTyrSerIleThrAsnGlySer
1327 GCAATTCACATTCACACAGCTAATGCTTATGACAGTGCCTGATGTGATCACAAACCCACAAATTTCCAGGGGATGTAC
443 GlyAsnAspIleAlaThrAlaAsnAlaTyrAspSerAlaAspValIleThrAsnThrThrAsnPheArgGlyMetTyr
1405 ATTTGTGGAGCACTCCAGAGGGCTTGGGGCCATAGAGAGATCTCAAGTACAGCTTTCATACCACTGCTATTAGGGA
469 IleCysGlyAlaLeuGlnArgAlaTrpGlyAspLysLysIleSerSerThrAlaPheIleThrThrAlaIleLysGlu
1483 GGTATACGCTTAACCATCAATACATTTGACTGACAAAATTTGCTGTGTACCCAGGACCTCATGTTGCCAGGGAT
495 GlyAsnThrLeuLysProSerAsnThrIleAspMetThrLysIleAlaValTyrGlnAspThrHisValGlyArgAsp
1561 GTTCAACATCTGATGATACACTGGCAATCCTTGGTACACTGGATTTGGTGAACAGGCAATTTGGATCTAATAGGGAT
521 ValGlnThrSerAspAspThrLeuAlaIleLeuGlyTyrThrGlyIleGlyGluGlnAlaIleGlySerAsnArgAsp
1639 AGTGTGCTTCGATTAGCATGCTGCCGAAACTGGTCCCGCCGGGGAATCACCAATTTTCTACAAAATTTCTATT
547 SerValValArgIleSerMetLeuProGluThrGlyAlaArgGlyGlyAsnHisProIlePheTyrLysAsnSerIle
1717 AAGTTAGGATATGACTCAGGTCATTTGATGTTTCACTCACAATTTCTCCACACTCTAGACAACTCTCCCTCAAT
573 LysLeuGlyTyrValLeuArgSerIleAspValPheAsnSerGlnIleLeuHisThrSerArgGlnLeuSerLeuAsn
1795 CATFACTTGTACCACTGACTCATTTGCTGTTTATAGGATATAGACTCTAATGCTCTTGGTTTGTATGAGGGAT
599 HisTyrLeuLeuProProAspSerPheAlaValTyrArgIleIleAspSerAsnGlySerTrpPheAspValGlyIle
1873 GATAGTATGTTTTCTCTTGTGGTGTCTCAGTATCCCTAACTTGAGTTTCTCTTCTGCTCTCATCATGGGA
625 AspSerAspGlyPheSerPheValGlyValSerSerIleProLysLeuGluPheProLeuSerAlaSerTyrMetGly
1951 ATTCAGCTGCCAAGATTCGACTTGCCTCTAATATTAGGACTACTTGCACAAAATATGA
651 IleGlnLeuAlaLysIleArgLeuAlaSerAsnIleArgSerThrMetThrLysLeu***

Figura 2

```

1 ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTCCTTAATACTATGATTTGGGATCCCCACTTTAGATTGATTATTAACCCCRACAAA
1 MetCysSerThrCysAlaAsnValLeuLysTyrTyrAspTrpAspProHisPheArgLeuIleIleAsnProAsnLys
79 TTYCTTTCCTTGGCTTCTGTGATARTCCCTCTTATGTSTTTATCCCGAATFACTCCCTGAATTTGGAACTG TGG
27 PheLeuSerValGlyPheCysAspAsnProLeuMetCysCysTyrProGluLeuLeuProGluPheGlyThrValTrp
157 OACTGTGATCAOTCACCCTCCAAATTTATCTAGAGTCCATCCTTGTGTGATGACCAATGGGCTCCACTTACGAAAGCA
53 AspCysAspGlnSerProLeuGlnIleTyrLeuGluSerIleLeuGlyAspAspGluTrpAlaSerThrTyrGluAla
235 GTTGACCCAGTGGTCCACCAATGCATTGGGATAGTGCCTGGAAAGATCTTTCAGCCACATCCTCGTGTATTCATGCCAC
79 ValAspProValValProProMetHisTrpAspSerAlaGlyLysIlePheGlnProHisProGlyValLeuMetHis
313 CATCTGATTTGGTGAAGTTGCTAAGCCCTGGCATCCAAACTTACCACCTCTTTCGTCTGGAAAGCCGATGGATCTGTG
109 HisLeuIleGlyGluValAlaLysAlaTrpAspProAsnLeuProLeuPheArgLeuGluAlaAspAspGlySerVal
391 ACCACCCCTGAACAAGGAACACTGGTTCGTGGAGTCTTGTGAGCCTAATGCCCAATGTCAGCTGTTCTGTACCGTG
131 ThrThrProGluGlnGlyThrLeuValGlyGlyValIleAlaGluProAsnAlaGlnMetSerAlaValAlaAspVal
469 GCCACTGGGAAAATGTTGACTCTGAGTGGGAAAGCATTCTCTCTTCCACACCGAGTGTCAATGGAGCACATCTGAA
157 AlaThrGlyLysSerValAspSerGluTrpGluAlaPhePheSerPheHisThrSerValAsnTrpSerThrSerGlu
547 ACCCAAGCGAAAATCCTTTTAAACAATCTCTAGTCCCTACTTAAACCCTTACTCTACCTCCGCAAAACTTTAT
183 ThrGlnGlyLysIleLeuPheLysGlnSerLeuGlyProLeuLeuAsnProTyrLeuThrHisLeuAlaLysLeuTyr
625 CTTCATCGCTCTGCTTCTATTGAGGTTAGATTTCAATTTCTGGATCTGGTGTCTTTGGTGGAAACTGCTGCTATT
209 ValAlaTrpSerGlySerIleGluValArgPheSerIleSerGlySerGlyValPheGlyGlyLysLeuAlaAlaIle
703 GTTGTGCCACCCGGATGGATCCCTGCAAGCACATCAATGTTCAGTACCCCGTGTCTCTGTTGATGCTCTCTCAA
235 ValValProProGlyIleAspProValGlnSerThrSerMetLeuGlnTyrProHisValLeuPheAspAlaArgGln
781 GTTGAACCCGTTTACTTCTACTATCCCTGATTTGAGAAATAGTCTATATCACCTATGTCTGACACTGATCTACACT
261 ValGluProValIlePheThrIleProAspLeuArgAsnSerLeuTyrHisLeuMetSerAspThrAspThrThrSer
859 CTTCGATTTGATATACAATGATCTCATTAACTCCCTATGCTAATGATCTAACTCATCTGGATGCATTTGTACTGTG
287 LeuValIleMetIleTyrAsnAspLeuIleAsnProTyrAlaAsnAspSerAsnSerSerGlyCysIleValThrVal
937 GAGACAAAACCTGGCCCGATTTCAAATTTCACTCTTGAACCCGCTGGGTCTATGTTAACTCATGGTCAATTTCCA
313 GluThrLysProGlyProAspPheLysPheHisLeuLeuLysProProGlySerMetLeuThrHisGlySerIlePro
1015 TCCGACCTTATCCCAAATCTTCTCTCTTGGATTTGGCACCACCTGCTGATATACTGATTTTGTCTATCAA
339 SerAspLeuIleProLysSerSerSerLeuTspIleGlyAsnArgHisTrpSerAspIleThrAspPheValIleLys
1093 CCTTTTGTTCCTCCAGGCTTATCGACATTTGACTTCAATCAAGAGACTGCAGGCTGGAGCACTCCAGATTTAGACCC
369 ProPheValPheGlnAlaAsnArgHisPheAspPheAsnGluThrAlaGlyTrpSerThrProArgPheArgPro
1171 ATAACCATCACGTTTCTGAGAAGGGAGGATCAAAATTTGGTATTCGTGTTGCACTGACTCTATTGTCCTGGCATA
391 IleThrIleThrValSerGluLysGlyGlySerLysLeuGlyIleGlyValAlaThrAspSerIleValProGlyIle
1249 CCAGACCGCTGGCCGGATACCACCATTCAGAAAACCTTACCCGACGAGTGCATATGCATCACAAATGGCCGAAAC
417 ProAspGlyTrpProAspThrThrIleProGluLysLeuThrProAlaGlyAspTyrAlaIleThrAsnGlyGlyAsn
1327 AATGACATCACCACTGCTGCGACTATGATGGGCGAGTATAATCAAAAACAATCAAAATTTCAAGGGTATGTATATT
443 AsnAspIleThrThrAlaAlaAspTyrAspGlyAlaSerIleIleLysAsnAsnThrAsnPheLysGlyMetTyrIle
1485 TGTGGTCTTTTCCAAAGAGCTTGGGCTGACBAGAAAATTTCAABCACCTGCCCTTATCACTACCCGATCACAGAGGGT
469 CysGlyAlaLeuGlnArgAlaTrpGlyAspLysLysIleSerAsnThrAlaPheIleThrThrAlaIleArgGluGly
1483 AACTCAATAAAACCATCTAATGTAATGACATGACAAACTTCCCGTTTATCAAGATGCTCATGTTGGTGCAGACTT
495 AsnSerIleLysProSerAsnValIleAspMetThrLysLeuAlaValTyrGlnAspAlaHisValGlyAlaGluLeu
1561 CAARCTCTGACATCACCTTAGCAATCCTTGGTINATCCCGGATTCGTGAGAGAGCTATAGCCCTGGATAGGRCAAA
521 GlnThrSerAspIleThrLeuAlaIleLeuGlyTyrThrGlyIleGlyGluGluAlaIleGlyLeuAspArgAspLys
1639 GTGGTGGTATTAGCATACTTCCAGAACTGCTGCTGGGCGGAAATCACCCATTTTCTATATGACAAAATTTAA
547 ValValArgIleSerIleLeuProGluThrGlyAlaArgGlyGlyAsnHisProIlePheTyrMetAsnLysIleLys
1717 TTAGGTTGTTGTTATTAGATCAATAGATGCTGCCAAACTCCCAATTTTACATACATCTAGGCBATTATCACTCAATAT
573 LeuGlyTyrValIleArgSerIleAspValAlaAsnSerGlnIleLeuHisThrSerArgGlnLeuSerLeuAsnAsn
1795 FATCTACTGCTCCTGACTCCTTTCAGTTCACAGAATTATTGATTCCTGCCGCTCTTGTGTTTGTATTTGGTATTGAT
589 TyrLeuLeuAlaProAspSerPheAlaValTyrArgIleIleAspSerGlyGlySerTrpPheAspIleGlyIleAsp
1873 AGTGTGGTFTTCTTTTCTTGTGCTATCTCAAATTTGAAAATTTGGAGTTTCCACTAATCCTCCTACATGGGAATT
625 SerAspGlyPheSerPheValGlyValSerGlnIleGlyLysLeuGluPheProLeuThrAlaSerTyrMetGlyIle
1951 CAATTTGCCAAGATTCGACTTGCCTCAAACATTTGGAGTGGATGGTTAATATGA
651 GlnLeuAlaLysIleArgLeuAlaSerAsnIleArgSerGlyMetValLysIle***

```

Figura 3

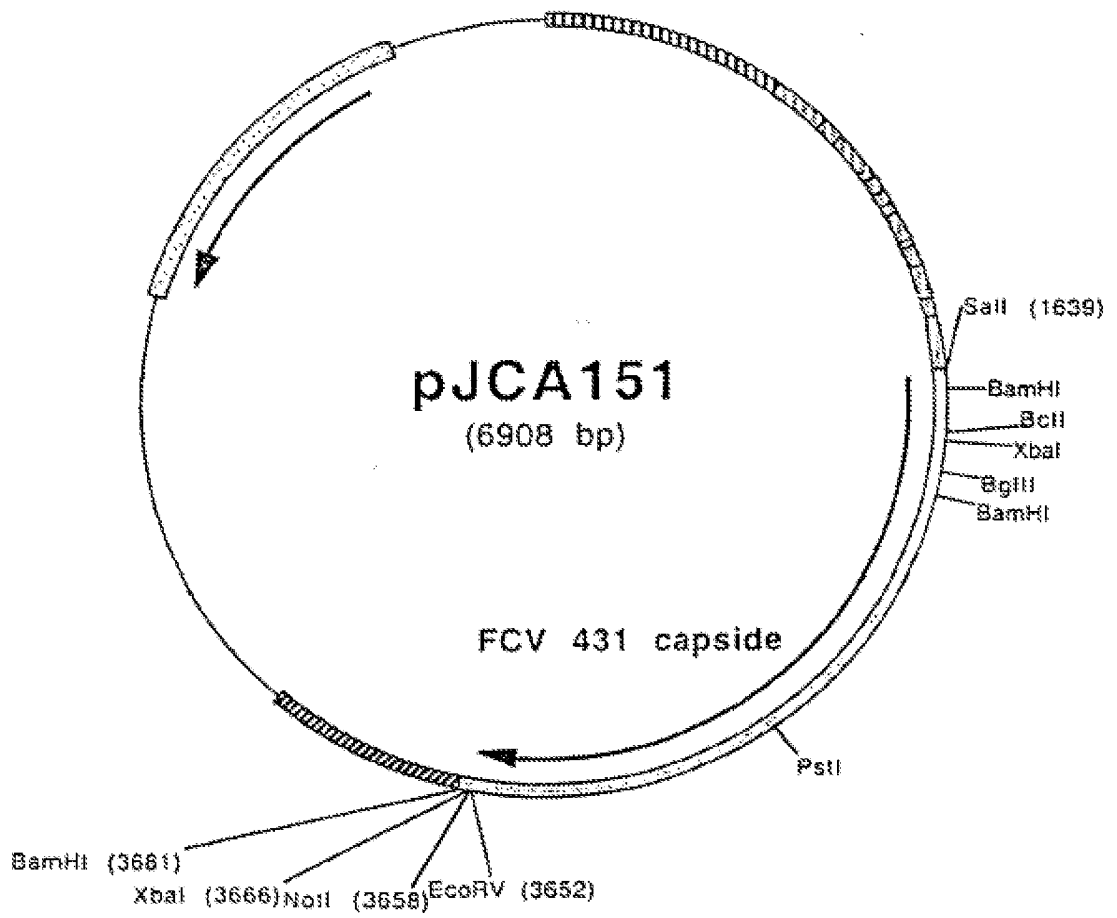


Figura 4

AAGCTTCTAT CAAAAGTCTT AATGAGTTAG GTGTAGATAG TATAGATATT ACTACAAGG	60
TATTCATATT TCCTATCAAT TCTAAAGTAG ATGATATTAA TAACTCAAAG ATGATGATAG	120
TAGATATATG ATACGCTCAT ATAATGACTG CAAATTTGGA CGGTTCCACAT TTTAATCATC	180
ACGCGTTCCAT AAGTTTCAAC TGCATAGATC AAAATCTCAC TAAAAAGATA GCCGATGTAT	240
TTGAGAGAGA TTGGACATCT AACTACGCTA AAGAAATTAC AGTTATAAAT AATACATAAT	300
GGATTTTGTT ATCATCAGTT ATATTTAACA TAAGTACCAAT AAAAAGTATT AAATAAAAT	360
ACTTACTTAC GAAAAAATGT CATTATTACA AAAACTATAT TTTACAGAAC AATCTATAGT	420
AGAGTCCTTT AAGAGTTATA ATTTAAAGA TAACCATAAT GTAATATTTA CCACATCAGA	480
TGATCATACT GTTGTAGTAA TAAATGAACA TAATGTACTG TTATCTACAA GATTATTATC	540
ATTTGATAAA ATTCTGTTTT TTAACCTCCTT TAATAACGGT TTATCABAAT ACGAAACTAT	600
TAGTGATACA ATATTAGATA TAGATACTCA TAATTATTAT ATACCTAGTT CTTCTTCTTT	660
GTTAGATATT CTAAAAAAA GAGCGTGTGA TTTAGAATTA CAAGATCTAA ATTATGCGTT	720
AATAGGAGAC AATAGTAACT TATATTATAA AGATATGACT TACATGAATA ATTGGTTATT	780
TACTAAAGGA TTATTAGATT ACAAGTTTGT ATTATTGGCC GATGTAGATA AATGTTACAA	840
ACAGTATAAT AAAAAGAATA CTATAATGA TATAATACAT CGCGATAACA GACAGTATAA	900
CATATGGGTT AAAAATGTTA TAGAATACTG TTCTCCTGGC TATATATTAT GGTTACATGA	960
TCTAAAAGCC GCTGCTGAAG ATGATTGGTT AAGATACCGAT AACCGTATAA ACGAATTATC	1020
TCCGGATAAA TTATACACTT TCGAGTTCAT AGTTATATTA GAAAATAATA TAAAACATTT	1080
ACGAGTAGGT ACAATAATTG TACATCCAAA CAGATAATA GCTAATGGTA CATCTAATAA	1140
TATACTTACT GATTTTCTAT CTTACGTAGA AGAACTAATA TATCATCATA ATTCATCTAT	1200
AATATTGGCC GGATATTTTT TAGAATTCTT TGAGACCACCT ATTTATCAG AATTTATTTT	1260
TTCATCTTCT GAATGGGTAA TGAATAGTAA CTGTTTAGTA CACCTGAAAA CAGGGTATGA	1320

Figura 4 (continuação)

AGCTATACTC	TTTGATGCTA	GTTTATTTTT	CCAACTCTCT	ACTAAAAGCA	ATTATGTAAA	1380
ATATTGGACA	AAGAAAACCT	TGCAGTATAA	GAACTTTTTT	AAAGACGGIA	AACAGTTAGC	1440
AAAATATATA	APTAAGAAAAG	ATAGTCAGGT	GATAGATAGA	GTATGTTATT	TACACGCAGC	1500
TGTATATAAT	CACGTAACCT	ACTTAATGGA	TACGTTTAAA	ATTCCCTGGT	TTGATTTTAA	1560
ATTCTCCGGA	ATGATAGATA	TACTACTGTT	TGGATATTG	CATAAGGATA	ATGAGAAAT	1620
ATTTTATCCG	AACCGTGT	CTGTAACTAA	TATAATATCA	GAATCIATCT	ATGCAGATTT	1680
TTACETTATA	TCAGATGTTA	ATAAATTCAG	TAAAAGGATA	GAATATAAAA	CTATGTTTCC	1740
TATACTCGCA	GAAACTACT	ATCCAAAAGG	AAGGCCCTAT	TTTACACATA	CATCTAACGA	1800
AGATCTTCTG	TCTATCTGTT	TATGCCAAGT	AACAGTTTGT	AARGATATA	AAAATCCATT	1860
ATTATATCT	AAAAGGATA	TATCAGCAAA	ACGATTCATA	GGTTTATTTA	CATCTGTGGA	1920
TATAAATACG	GCTGTTGAGT	TAAGAGGATA	TAAAATAAGA	GTATFAGGAT	GTTTAGAATG	1980
GCCTGAAAAG	ATAAAAATAT	TTAATTCTAA	TCCTACATAC	ATTAGATTAT	TACTAACAGA	2040
AAGACGTTTA	GATATTCTAC	ATTCCATCT	GTTTAAATTT	AATATAACAG	AGGATAFAGC	2100
TACCCAGAGAT	GGAGTCAGAA	ATAAATTACC	TATAATTTCT	TTTATCGTCA	GTTATTTGAG	2160
ATCGTATACT	TATAAATTAC	TAATTGCCA	TATGTACAAT	TCGTGTAAGA	TAACAAAGTG	2220
TAAATATAT	CAGGTAATAT	ATAATCCTAT	ATAGGAGTAT	ATATAATTGA	AAAAGTAAAA	2280
TATAAATCAT	ATAATAATGA	AACGAAATAT	CAGTAATAGA	CAGGAACTGG	CAGATTCCTC	2340
TTCTAATGAA	GTAAGTACTG	CTAATCTCC	AAAATTAGAT	AAAATGATA	CAGCAATAC	2400
AGCTTCATTC	AACGAATTAC	CTTTAATTT	TTTCAGACAC	ACCTTATTAC	AAACTAACTA	2460
AGTCAGATGA	TCAGAAAAGTA	AATATAAATT	TAACCTTATGG	GTATAATATA	ATAAAGATTC	2520
ATGATATTAA	TAATTTACTT	AACGATGTEA	ATAGACTTAT	TCCATCAACC	CCTTCAAACC	2580
TTTCTGGATA	TTATAAATA	CCAGTTAATG	ATATTAAAT	AGATGTTTA	AGAGATGTAA	2640
ATAATTAATT	GGAGGTAAG	GATATAAAT	TAGTCTATCT	TTCACATGGA	AATGAAATAC	2700
CTAATATTAA	TAATTATGAT	AGGAATTTTT	TAGGATTTAC	AGCTGTTATA	TGTATCAACA	2760

Figura 4 (continuação e final)

ATACAGGCAG	ATCTATGGTT	ATGGTAAAAC	ACTGTAACGG	GAAGCAGCAT	TCTATGGTAA	2820
CTGGCCTATG	TTFAATAGCC	AGATCATTFT	ACTCTATAAA	CATTTTACCA	CAAATAATAG	2880
GATCCTCTAG	ATATTTAATA	TTATATCTAA	CAACAACAAA	AAAATTTAAC	GATGTATGGC	2940
CAGAAGTATT	TTCTACTAAT	AAAGATAAAG	ATAGTCTATC	TTATCTACAA	GATATGAAAG	3000
AAGATAATCA	TTAGTAGTA	GCTACTAATA	TGGAAAGAAA	TGTATACAAA	AACGTGGAAG	3060
CTTTTATATT	AAATAGCATA	TTACTAGAAG	ATTTAAAATC	TAGACTTAGT	ATAACAAAAC	3120
AGTTAATGCG	CAATATCGAT	TCTATATFTC	ATCATAACAG	TAGTACATTA	ATCAGTGATA	3180
TACTGAAACG	ATCTACAGAC	TCAACTATGC	AAGGAATAAG	CAATATGCCA	ATTATGTCTA	3240
ATATTTTAAAC	TTTAGAACTA	AAACGTTCTA	CCAATACTAA	AAATAGGATA	CGTGATAGGC	3300
TGTTAAAAGC	TGCAATAAAT	AGTAAGGATG	TAGAAGAAAT	ACTTTGTTCT	ATACCTCCGG	3360
AGGAAAGAAC	TTTAGAACAA	CTTAAGTYTA	ATCAARCTTG	TATTTATGAA	CACTATAAAA	3420
AAATTATGGA	AGATACAAGT	AAAAGATGG	ATGTTGAATG	TCGTAGTTTA	GAACATAACT	3480
ATACGGCTAA	CTTATATAAA	GTGTACGGAC	AAAACGAATA	TATGATTACT	TATATACTAG	3540
CTCTCATAAG	TAGGATTAAT	AATATTATAG	AACTTTAAA	ATATAATCTG	GTGGGGCTAG	3600
ACGAATCTAC	AATACGTAAT	ATAAATTATA	TAATTTTACA	AAGAACAAA	AAAAATCAAG	3660
TTCTAATAC	CTTATAGATA	AACTATATT	TTTACCCTG	A		3701

Figura 5

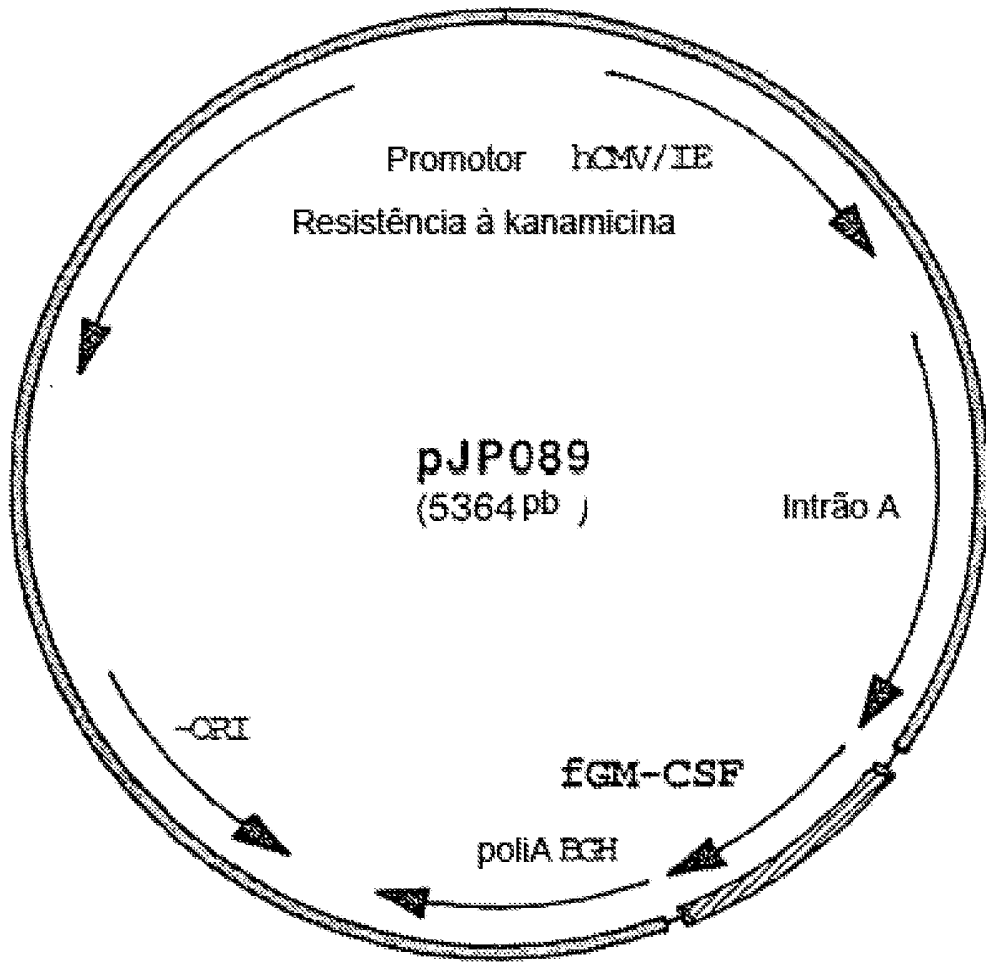


Figura 6

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC CTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCC
 TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG GAC CCG TCA CAC CAG ACC TCG TAG AGA CGT GGG
 1 Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro
 1965 ACC AGT TCA CCC AGC TCT GTC ACT CCG CCC TGG CAA CAC GTG GAT GCC ATC AAG GAG
 TGG TCA AGT GGG TCG AGA CAG TGA GCC GCG ACC CTT GFG CAC CTA CCG TAG TTC CTC
 20 Thr Ser Ser Pro Ser Ser Val Thr Arg Pro Trp Gln His Val Asp Ala Ile Lys Glu
 2023 CCT CTG ACC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAA ATA ACT GCT GTG ATG AAT GAA SCA GTA
 CGA GAC TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTT TAT TGA CGA CAC TAC TTA CTT CTT CAT
 39 Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Ser Glu Ile Thr Ala Val Met Asn Glu Ala Val
 2089 GAA GTC GTC TCT GAA ATG TTT GAC CCT GAG GAG CCG AAA TCG CTG CAG ACT CAC CTA
 CTT CAG CAG AGA CTT TAC AAA CTG GGA CTC CTC GGC TTT ACC GAC GTC TGA GTG GAT
 53 Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp Pro Glu Glu Pro Lys Cys Leu Gln Thr His Leu
 2137 AAG CTG TAC GAG CAG GGC CTA CCG GGC AGC CTC ATC ACC CTC AAG GAG CCT CTG AGA
 TTC GAC ATG CTC GTC CCG GAT GCC CCG TCG GAG TAG TCG GAG TTC CTC GGA GAC TCT
 77 Lys Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Ile Ser Leu Lys Glu Pro Leu Arg
 2194 ATG ATG GCG AAC CAT TAC AAG CAG CAC TGC CCC TTT ACT CCG GAA ACC CCC TGT GAA
 TAC TAC CCG TTG GTA ATG TTC GTC GTG ACG GCG AAA TGA GGC CTT TGC GGG ACA CTT
 96 Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Phe Thr Pro Glu Thr Pro Cys Glu
 2251 ATC CAG ACT ATC ACC TTC AAA AAT TTC AAA GAG AAT CAG AAG GAT TTT CTG TTT AAC
 TGG GTC TGA TAG TGG AAG TTT TTA AAG TTT CTC TTA GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG
 119 Thr Gln Thr Ile Thr Phe Lys Asn Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn
 2305 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA
 TAC GGG AAA CTG ACC ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT
 134 Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ...

Figura 7

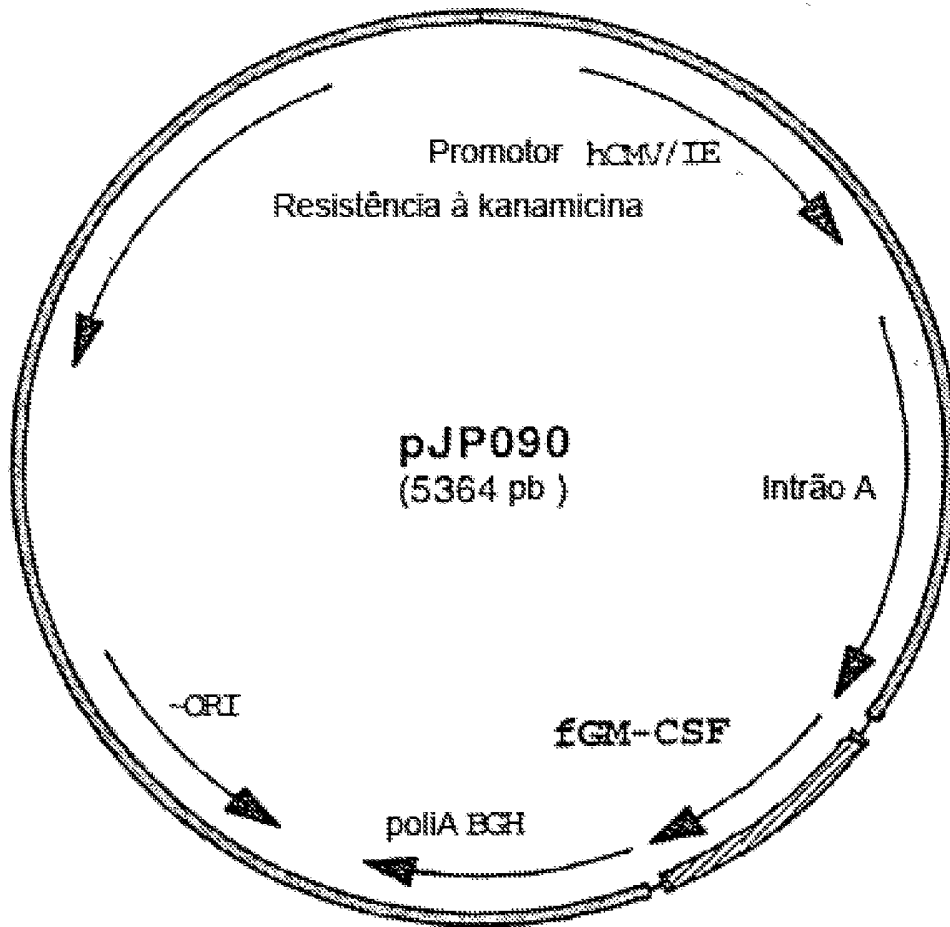


Figura 8

```

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC CTG GGC ACT GTG GTC TGC ACC ATC TCT GCA CCC
    TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG GAC CCG TGA CAC CAG ACC TCG TAG AGA CGT GGG
    1 Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro
1966 ACC AGT TCA CCC AGC TCT GTC ACT CCG CCC TGG CAA CAC GTG GAT GGC ATC AAG GAG
    TGG TCA AGT GGG TCG AGA CAG TGA GGC GGG ACC GTT GTG CAC CTA CCG TAG TTC CTC
    20 Thr Ser Ser Pro Ser Ser Val Thr Arg Pro Trp Gln His Val Asp Ala Ile Lys Glu
2023 GCT CTG ACC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAA ATA ACT GCT GTG ATG AAT GAA GCA GTA
    GEA GAC TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTT TAT TGA CGA CAC TAC TTA CTT CGT CAT
    39 Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Ser Glu Ile Thr Ala Val Met Asn Glu Ala Val
2080 GAA GTC GTC TCT GAA ATG TTT GAC CCF GAG GAG CCG AAA TGC CTG CAG ACT CAC CTA
    CTT CAG CAG AGA CTT TAC AAA CTG GGA CTC CTC GGC TTT ACG GAC GTC TGA GTG GAT
    58 Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp Pro Glu Glu Pro Lys Cys Leu Gln Thr His Leu
2117 AAG CTG TAC GAG CAG GGC CTA CCG GGC ACC CTC ATC ACC CTC AAG GAG CCF CTG ACC
    TTC GAC ATG CTC GTC CCG GAT GGC CCG TCG GAG TAG TCG GAG TTC CTC GGA GAC TCC
    77 Lys Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Ile Ser Leu Lys Glu Pro Leu Arg
2194 ATG ATG CCC AAC CAG TAC AAG CAG CAC TGC CCC CTT ACT CCG GAA ACG CCC TGT GAA
    TAC TAC CCG TTG GTA ATG TTC GTC GTC ACC GGG GAA TGA GGC CTT TGC GGG ACA CTT
    96 Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Leu Thr Pro Glu Thr Pro Cys Glu
2251 ACC CAG ACT ATC ACC TTC AAA AAT TTC AAA GAG AAT CTG AAG GAT TTT CAG TTT AAC
    TGG GTC TCA TAG TGG AAG TTT TTA AAG TTT CTC TTA GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG
    115 Thr Gln Thr Ile Thr Phe Lys Asn Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn
2308 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA
    TAG GGG AAA CTG ACG ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT
    134 Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ***

```

Figura 9

Isolador/Soro	S/A2	S/F1	SrG1	SrD-2	SrG3	rF303	SrH1-e	Sr399c	Sr401	Sr337	Sr25	SrFM1	SrFM2	SrFM3	SrFM6	SrFM7	SrFM9	Sr255	SrFB
A2 (FR)	3.5	0.8	2.5	1.2	1.0	1.8	1.3	0.7	0.6	1.1	0.8	0.7	0.7	0.7	2.0	1.2	0.7	1.7	1.8
F1 (FR)	1.2	3.0	2.2	1.9	0.9	1.1	1.0	1.9	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0
G1 (FR)	1.6	0.8	2.9	1.2	1.0	1.7	0.7	0.9	2.6	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	1.1
H3-2 (FR)	0.7	0.7	0.7	2.8	0.7	0.7	0.9	0.8	1.3	0.7	1.1	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
G3 (FR)	1.0	1.1	2.4	1.7	3.8	1.6	1.3	0.9	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8
F303 (FR)	2.4	1.5	2.0	1.7	1.2	3.8	1.1	1.2	2.0	0.7	1.2	0.8	0.7	0.7	1.0	0.7	1.2	1.1	2.0
H1-4 (FR)	0.7	0.7	1.1	1.2	0.7	0.7	3.2	0.7	1.3	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7
399c (UK)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	3.3	2.1	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
401 (UK)	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	1.3	3.5	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7
337 (UK)	1.0	0.7	1.1	0.7	0.7	0.9	1.1	1.2	2.2	3.2	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.9	0.7
J5 (UK)	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	1.1	0.8	1.8	0.7	3.3	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
RM1 (US)	0.7	0.7	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	1.1	1.6	0.7	1.0	2.7	0.7	0.7	1.0	1.3	0.7	0.7	0.7
RM2 (US)	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	0.7	1.3	0.7	2.3	0.7	1.3	1.3	1.8	0.7	0.7
RM3 (US)	0.7	0.7	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	1.3	1.5	1.8	1.0	2.6	2.2	3.1	2.0	1.3	1.8	1.2	0.7
RM5 (US)	1.2	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	1.5	1.9	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	2.4	1.9	0.7	0.7	0.7
RM6 (US)	1.2	0.7	1.2	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	1.0	0.7	1.4	1.1	1.2	0.7	2.5	0.7	2.5	0.7	0.7
RM7 (US)	1.1	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	1.3	0.7	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	3.0	0.7	0.7	0.7
RM9 (US)	1.1	0.7	1.2	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.5	0.7	2.4	0.7	0.7

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- FR 2741886 A
- WO 9215672 A
- WO 9526751 A
- WO 9012882 A
- WO 9527780 A
- EP 0803573 A1
- WO 8608166 A
- US 5122458 A
- US 2909462 A
- WO 9634109 A
- WO 9803660 A
- US 4745051 A
- JP 578 A
- JP 579 A
- CA 92937

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- FASTIER L.B. *Am. J. Vet. Res.*, 1957, vol. 16, 382-389
- COUTTS et al. *Vet. Rec.*, 1994, vol. 135, 555-556
- ELLIS T.M. *Australian Vet. J.*, 1961, vol. 57, 115-118
- HARBOUR et al. *Vet. Rec.*, 1991, vol. 128, 77-80
- REUBEL et al. *Feline Dentistry*, 1992, vol. 22, 1347-1360
- JOHNSON R.P. *Res. Vet. Sci.*, 1984, vol. 31, 114-119
- WARDLEY B.C. *Arch. Virol.*, 1978, vol. 52, 243-249
- CARTER M.J. *Arch. Virol.*, 1994, vol. 9, 429-439
- RADFOORD et al. *Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV*, 1997, 93-99
- CARTER et al. *Arch. Virol.*, 1982, vol. 122, 223-235
- NEILL et al. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, 5440-5447 [0006]
- SOŠNOVTSEV ; GREEN. *Virology*, 1995, vol. 210, 383-390
- TOHYA et al. *Arch. Virol.*, 1991, vol. 117, 173-181
- FASTIER L.B. *Am. J. Vet. Res.*, 1957, vol. 18, 882-899
- KAHN ; GILLEPSIE. *Cornell Vet.*, 1970, vol. 60, 669-683
- BITTLE et al. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, vol. 21, 547-550
- KAHN ; GILLEPSIE. *Cornell Vet.*, 1970, vol. 60, 669-683
- PEDERSEN et al. *Fel. Prac.*, 1983, vol. 13, 26-35
- GUIVER et al. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, 2429-2433
- GLENN et al. *Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV*, 1997, 106-110
- GEISSLER et al. *Virus Res.*, 1997, vol. 48, 193-206
- NEILL et al. *Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV*, 1997, 120-124
- GEISSLER et al. *J. Virol.*, 1999, vol. 73 (8) 634-638
- DESILVER et al. *Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV*, 1997, 131-143
- YOKOYAMA et al. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998, vol. 60, 717-723
- LAURITZEN et al. *Vet. Microbiol.*, 1997, vol. 56, 55-63
- TOHYA Y. et al. *Jpn. J. Sci.*, 1990, vol. 52, 955-961
- POULET et al. *Arch. Virol.*, Février 2000, vol. 145 (2), 243-261
- POVEY C. ; INGERSOLL J. *Infection and Immunity*, 1975, vol. 11, 877-885
- TAYLOR J. et al. *Vaccine*, 1988, vol. 6, 504-508
- GUO P. et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 4189-4196
- PERKUS M. et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 3829-3836
- VAN OUYEN et al. *Science*, 1979, vol. 206, 337-344
- MONTGOMERY et al. *Cell. Mol. Biol.*, 1987, vol. 43, 285-292
- *Pharmeuropa*, Juin 1996, vol. 8 (2) [0050]
- J. FIELDS et al. *Nature*, 04 Juin 1960, vol. 186, 778-780
- FIERS et al. *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0069]
- MCGREGOR ; CASKEY. *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 2385

- HOOFT VAN IDEKINGE et al. *Virology*, 1983, vol. 131, 561-565
- K.Y. GREEN et al. *J. Clin. Microb.*, Juillet 1987, vol. 35 (7), 1909-1914
- Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1985, 147 [0074]
- TANG et al. *Nature*, 1992, vol. 356, 152-154 [0079]
- FURTH et al. *Analytical Bioch.*, 1992, vol. 205, 365-368
- SAMBROOK J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- CRANDELL et al. *In Vitro*, 1973, vol. 9, 176-185
- HARTIKKA J. et al. *Human Gene Therapy*, 1997, vol. 7, 1205-1217
- PANICALI; PAOLETTI. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1982, vol. 79, 4927-4931
- PICCINI et al. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1987, vol. 153, 545-563