

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

(21) PI 1006648-9 A2



(22) Data de Depósito: 27/05/2010

(43) Data da Publicação: 11/08/2015
(RPI 2327)

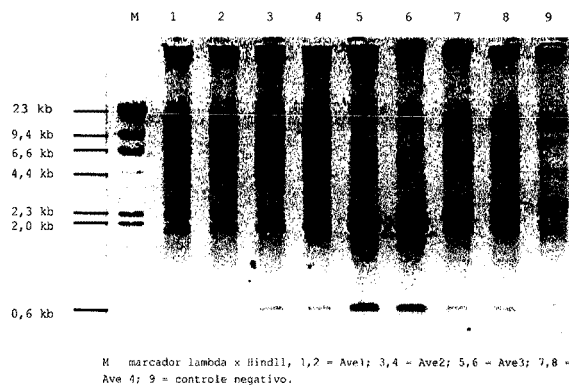
(54) Título: CLONAGEM DO DNA DO GYROVÍRUS DAS GALINHAS TIPO 2

(51) Int.Cl.: C12N15/34; C12N15/86; C07K14/01; C07K16/08; A61K39/12; G01N33/569

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Ana Cláudia Franco, Franciscus Antonius Maria Rijsewijk, Paulo Michel Roehle

(57) Resumo: CLONAGEM DO DNA DO GYROVÍRUS DAS GALINHAS TIPO 2. DNA ou RNA recombinantes, composto pelo Gyrovírus das galinhas tipo 2 (Sigla inglês: Chicken Gyrovirus type 2 (CGV2)-sequências de nucleotídeos específicas e sua utilização para vacinação, produção de proteínas, diagnósticos ou para terapia anti-câncer. Proteína recombinante de CGV2 e sua utilização para diagnósticos, vacinação ou produção, uso de anticorpos anti-CGV2 específicos e a utilização de proteínas recombinantes CGV2 para terapia anti-câncer.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

CLONAGEM DO DNA DO GYROVÍRUS DAS GALINHAS TIPO 2

5 **Estado da Arte**Vacinas e Diagnósticos

M.H.M.NOTEBORN MATHIEU e G.F. DE BOER, CLONING OF CHICKEN ANEMIA VIRUS DNA, Numero de publicação: US2006073160 (A1) Data de publicação: 2006-04-06, data de prioridade: 10 Set. 12 1990, NL 9002008, Set. 11 1991 PCT/ NL91 00165.

P.J. SONDERMEIJER e J.A. CLAESSENS, CHICKEN ANEMIA VIRUS VACCINE AND DIAGNOSTIC REAGENT, Numero de publicação: KR100204438 (B1) , Data de publicação: 1999-06-15.

G. KOCH GUUS, M.H.M. NOTEBORN, CHICKEN ANEMIA VIRUS 15 MUTANTS AND VACCINES BASED ON THE VIRAL PROTEIN VP3 OR SEQUENCES OF THAT VIRUS CODING THEREFORE. Patente Aplicação: PT1253201 (E), Publicação data: 2008-10-27. [Também como WO9503414 (A2)]

Terapia anti-câncer.

20 S. PANIGRAHI and M. LOS, APOPTIN INDUCES INHIBITION OF BCR-ABL KINASE IN CML CELLS, Aplicação de patente: WO2009055907 (A1), data 2009-05-07.

Campo da Invenção

25 Esta invenção está no campo da tecnologia da engenharia genética por meio de DNA recombinante (e RNA), imunização / vacinação, diagnóstico e terapia anti-câncer. Mais especificamente, a invenção refere-se à detecção, clonagem e análise da seqüência do genoma do DNA do girovirus de 30 galinhas tipo 2 (CGV2) e às suas aplicações.

Justificativa

Genomas de DNA de um novo membro da família *Circoviridae* foram descobertos em galinhas com uma doença cerebral de causa desconhecida. Este novo membro foi chamado girovírus das galinhas tipo 2.

Circoviridae

Os membros de uma família de vírus pequenos, de DNA circular que infectam hospedeiros vertebrados, nomeada *Circoviridae*, estão divididos em dois gêneros, *Gyrovirus*, que inclui o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV ou girovírus das galinhas tipo 1) e *Circovirus*, que inclui os circovírus de suínos (PCV). Vírus de DNA circular de orientação negativa tais como o *torque teno virus* (TTV) de humanos e suínos e *torque teno-like mini-virus* (TTMV), tem sido classificados como um gênero flutuante da mesma família, chamado de *Anellovirus*. Estes anelovírus compartilham homologia de seqüências com outros membros da família *Circoviridae*. [McNulty et al., 2000. McNulty, M., Dale, J., Lukert, P., Mankertz, A., Randles, J., Todd, D., 2000. *Circoviridae*. In: van Regenmortel, C.M.F.M.H.V., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.), *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, pp. 299-303.]

Os genomas encapsidados dos membros da família *Circoviridae* consistem em fitas simples de DNA circular. Em células infectadas, o DNA viral é encontrado nas formas de fita simples e dupla. Os genomas possuem de 1,7 a 3,8 Kb e análises de bioinformática revelaram pelo menos três regiões de fase de leitura aberta (ORFs, ORF1, ORF2 e ORF3). Em *Gyrovirus* (CAV) e *Anellovirus* (TTMV e TTV) estas ORFs estão na mesma fita e é a fita anti-sense que é encapsidada nos

vírions [Mankertz A, Hillenbrand B., Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1 J Gen Virol. 2002 Nov;83(Pt 11):2743-51.]

Proteínas dos circovírus

5 Proteínas do CAV

Até o momento, com base em resultados de seqüenciamento genômico e expressão de ORFs de CAV, foram identificadas três proteínas codificadas por este vírus: VP1, VP2 e VP3 [SCHAT, K. A. Chicken Infectious Anemia. IN: SAIF, Y.M., et al. 10 (eds). Diseases of poultry. 11th. ed. Ames: Iowa State Press; 2003.]. Estas três proteínas são produzidas por uso de sítios alternativos de processamento de um só RNA mensageiro. A ORF3 do CAV está localizada dentro da ORF2 e esta se sobrepõe à ORF1. A VP1 do CAV é o principal componente do capsídeo e 15 antígeno viral e a única proteína encontrada em partículas virais purificadas [Koch G, van Roozelaar DJ, Verschueren CA, van der Eb AJ, Noteborn MH., Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. Vaccine. 1995;13(8):763-70, Noteborn MH, 20 Verschueren CA, Koch G, Van der Eb AJ., Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. J Gen Virol. 1998 Dec;79 (Pt 12):3073-7.]

25 A VP2 é uma proteína não estrutural que serve como chaperona para a VP1, modelando-a na conformação adequada para exposição de epitopos virais [Koch G, van Roozelaar DJ, Verschueren CA, van der Eb AJ, Noteborn MH., Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins 30 expressed by baculovirus. Vaccine. 1995;13(8):763-70, Noteborn MH, Verschueren CA, Koch G, Van der Eb AJ., Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded

chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. J Gen Virol. 1998 Dec;79 (Pt 12):3073-7.] A VP2 também tem atividade de fosfatase e afeta a multiplicação e patogenicidade virais [Peters MA, Crabb BS, Washington EA, Browning GF., Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of Chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. J Gen Virol. 2006 Apr;87(Pt 4):823-31].

10 A VP3, por outro lado, está associada ao núcleo de células infectadas e não é encontrada em partículas virais purificadas. Ela é a proteína responsável por indução de apoptose em células infectadas [SCHAT, K. A. Chicken Infectious Anemia. IN: SAIF, Y.M., et al. (eds). Diseases of poultry. 11th. ed. Ames: Iowa State Press; 2003.] como
15 detalhado abaixo.

Proteínas do PCV

A ORF1 codifica duas proteínas essenciais para a replicação, a Rep e a Rep' 2. [Cheung AK.,The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2.Virology. 2003 Sep 1;313(2):452-9.]

A proteína Rep possui 312 aminoácidos, sendo a tradução completa da ORF1, enquanto que a Rep' possui 168 aminoácidos e é o produto da clivagem do mRNA transcrito da ORF1 [Mankertz A, Hillenbrand B., Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1 J Gen Virol. 2002 Nov;83(Pt 11):2743-51.] . A proteína do capsídeo (Cap) do PCV apresenta massa molecular de aproximadamente 30 KDa e é codificada pela
25
30 ORF2. Estudos mostraram que a expressão da proteína recombinante da ORF2 produz partículas semelhantes a vírus, sugerindo a sua capacidade de se autoencapsidar. [Nawagitgul

P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS., Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J Gen Virol. 2000 Sep;81(Pt 9):2281-7.]. Além disso, a proteína codificada pela ORF2 é imunodominante
5 Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumniyom N, Wajjawalku W, Meng XJ.,

Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. J Virol. 2004 Aug;78(15):8135-45.]. A proteína codificada pela
10 ORF3 é expressa predominantemente no núcleo e com menor frequência no citoplasma de células. Esta proteína viral do PCV está envolvida no processo de indução de apoptose pela ativação da rota iniciador caspase-8 e efetor caspase-3 [Liu J, Chen I, Kwang J., Characterization of a previously
15 unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. J Virol. 2005 Jul;79(13):8262-74.]

Proteínas dos TTVs

Em comparação com as proteínas de CAV e PCV, muito menos
20 se sabe sobre as proteínas codificadas pelos TTVs. Em analogia com a VP1 do CAV, a proteína do capsídeo do TTV também é codificada pela ORF1. Da mesma forma, as duas proteínas possuem uma região amino terminal hidrofílica com afinidade de ligação por DNA [Okamoto H, Mayumi M., TT virus:
25 virological and genomic characteristics and disease associations. J Gastroenterol. 2001 Aug;36(8):519-29]. No entanto, a ORF 1 de TTVs contém regiões hipervariáveis que podem apresentar alta diversidade genética, mesmo entre isolados do mesmo genótipo e encontrados no mesmo indivíduo
30 [Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, Zur Hausen H, de Villiers EM., Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome

reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol.* 2004 Jul;78(14):7498-507.] Foi demonstrado que algumas destas variações geram códons de terminação, o que origina a síntese de proteínas menores. Entretanto, as conseqüências
5 sobre a variabilidade antigênica ou patogênica destas variações não são conhecidas.

Embora haja similaridades entre as proteínas de TTVs e as proteínas de CAV, as funções das proteínas codificadas pelas ORF 2 e 3 dos TTVs ainda têm que ser elucidadas [Hino
10 S, Miyata H., .Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol.* 2007 Jan-Feb;17(1):45-57]. Uma das poucas evidências sobre estas funções mostram que a proteína ORF3 de TTVs clonada e expressa em linhagem celular de hepatocarcinoma é capaz de induzir apoptose [Kooistra K,
15 Zhang YH, Henriquez NV, Weiss B, Mumberg D, Noteborn MH., TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Virol.* 2004 Jun;85(Pt 6):1445-50].

Os circovírus são difíceis de se multiplicarem em
20 condições padrão de cultura de células, eles dependem do mecanismo de replicação da célula hospedeira, mas em células transformadas por vírus oncogênicos ou por oncogenes individuais, títulos mais altos podem ser obtidos. [Yuasa, 1983 N. Yuasa, Propagation and infectivity titration of the
25 Gifu-1 strain of chicken anemia agent in a cell line (MDCC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma, *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)* 23 (1983), pp. 13-20].

O CGV2 é um vírus recém descoberto e pertence à família Circoviridae e está implicado em hemorragias no cérebro de
30 galinhas infectadas [Roehle et al., publicação em preparação]. O CGV2 tem um genoma circular de cerca 2,4 kb. Moléculas do genoma completo foram isoladas pela primeira vez em 2008 no

Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, de soros de frangos com lesões cerebrais hemorrágicas. A análise da seqüência do genoma mostra que o CGV2 está relacionado com outros circovírus, como CAV [M.H. Noteborn, G.F. de Boer, D.J. van
5 Roozelaar, C. Karreman, O. Kranenburg, J.G. Vos, S.H. Jeurissen, R.C. Hoeben, A. Zantema, G. Koch, et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle, J. Virol. 65 (1991) 3131-3139.]. A similaridade global entre
10 os aminoácidos d CGV2 e do CAV é de cerca 40%.

Até agora o CGV2 só foi detectado em frangos comercialmente produzidos no Sul do Brasil, mas como aconteceu com outros circovírus, o vírus pode espalhar-se sobre todos os países de principais produtores de frangos
15 [Bulow, V., and K. A. Schat, 1997. Chicken Infectious Anemia. Pages 739-756 in: Diseases of Poultry. Chapter 30. Iowa State University Press; Ames, IA.]. Por outro lado, assim como o CAV, o qual já foi detectado em outras espécies de aves [T. Farkas ; K. Maeda ; H. Sugiura; K. Kai ; K. Hirai ; K. Otsuki
20 ;T. Hayashi, 1998. A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. Avian Pathology, Volume 27: 316 - 320], é possível que o CGV2 seja também capaz de infectar outras espécies como codornas, faisões ou perus.

25 Considerando-se que o CGV2 foi também isolado de frangos originados de matrizes vacinadas contra o CAV, há necessidade de desenvolvimento de uma vacina específica anti-CGV2.

Vacinas

30 Para proteger galinhas contra a infecção e doença por CGV2, a vacinação é o método de escolha. Os seguintes tipos de vacinas estão previstos:

Vacinas vivas atenuadas. Vacinas vivas atenuadas são constituídas por mutantes atenuados do CGV2. Estes mutantes podem ser os produtos da multiplicação do vírus em várias linhagens de células heterólogas. Eles têm uma capacidade
5 reduzida de causar doenças e ao mesmo tempo eles induzem uma resposta imunológica. Essas vacinas contêm vírus vivo que é capaz de infectar e se multiplicar no hospedeiro, o que aumenta a intensidade e a duração da resposta imune. Mas as vacinas vivas atenuadas também podem ser constituídas de
10 mutantes que são produtos de recombinação.

Vacinas recombinantes. Vacinas recombinantes de CGV2 são produzidas através da criação de uma mutação em uma região do genoma do vírus que não é essencial para a multiplicação do vírus. Uma outra forma de produzir uma vacina recombinante é
15 desenvolvendo um vetor viral que expressa uma parte do genoma do CGV2 que codifica um ou mais antígenos que estimulam uma resposta imune contra o CGV2. Essas vacinas também contêm vírus vivo que é capaz de infectar e se multiplicar no hospedeiro, o que aumenta a intensidade e a duração da
20 resposta imune.

Vacinas mortas (ou inativadas). Vacinas mortas de CGV2 são constituídas por altas doses do CGV2 morto. Vacinas mortas geralmente resultam em uma resposta imune mais fraca e mais curta do que as vacinas vivas, devido à sua incapacidade
25 de infectar e se multiplicar no hospedeiro.

Vacinas de sub-unidade. Vacinas de sub-unidade de CGV2 incluem doses de antígenos purificados extraídos do microorganismo causador da doença. Alternativamente, vetores que expressam regiões do genoma de CGV2 que codificam
30 proteínas imunogênicas como baculovírus recombinantes e herpesvírus (Marek e ITLV) são formas de vacinas de sub-unidade.

Vacinas de DNA. Essas vacinas contêm DNA purificado codificando antígenos do CGV2 que estimulam uma resposta imune contra CGV2.

Apoptose

5 Uma parte importante do conhecimento sobre a patogenicidade dos circovírus vem de estudos de infecção natural e experimental de galinhas com o CAV. Estudos sobre a patogenia da infecção causada por este vírus demonstraram que um fator essencial no desenvolvimento da doença clínica é a
10 indução de apoptose nas células infectadas. Esta função é induzida por uma das três proteínas virais, a VP3. A proteína VP3 não apresenta homologia de seqüência com nenhuma proteína celular conhecida e é uma proteína extremamente interessante, pois induz apoptose celular em células tumorais ou
15 transformadas, mas não em células não transformadas, ao contrário de outras proteínas virais indutoras de apoptose. A toxicidade seletiva da VP3 é atribuída principalmente à sua localização celular, pois em células não transformadas ela se acumula no citoplasma celular, ao contrário das células
20 tumorais, onde a proteína se localiza no núcleo celular, induzindo-as à apoptose. Este aspecto, aliado à habilidade da VP3 de atuar de forma independente da p53, traz consigo um incrível potencial farmacológico para uso em tratamento de tumores.

25 Conhecida como "morte celular programada", a apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução (diferentemente da necrose). Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode
30 também ser causada por um estímulo patológico (como a lesão ao DNA celular). O termo é derivado do grego, que se refere à queda das folhas das árvores no outono - um exemplo de morte

programada fisiológica que também implica renovação. Os vírus são conhecidos indutores e/ou bloqueadores de processos de apoptose [Teodoro JG, Branton PE., Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol.* 1997 Mar;71(3):1739-46]. Eles
5 podem se utilizar deste bloqueio ou indução para seu benefício próprio. Isto pode ocorrer conforme a fase do ciclo de multiplicação em que eles se encontram nas células, para manter as células vivas até que a progênie viral tenha alcançado os níveis máximos ou para facilitarem o processo de
10 disseminação viral nas células, alterando o ciclo celular e eventualmente levando à produção de tumores.

Um exemplo de vírus indutor de apoptose é o CAV. A indução de apoptose pelo CAV tem sido atribuída à VP3, uma proteína de 121 aminoácidos e 14 kDa não estrutural [M.H.
15 Noteborn, D. Todd, C.A. Verschueren, H.W. de Gauw, W.L. Curran, S. Veldkamp, A.J. Douglas, M.S. McNulty, E.A. van der, G. Koch, A single chicken anemia virus protein induces apoptosis, *J. Virol.* 68 (1994) 346-351; M.H. Noteborn, Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular
20 mechanisms, *Vet. Microbiol.* 98 (2004) 89-94]. Esta proteína pode induzir apoptose em um grande leque de células transformadas, mas não em células não transformadas ou primárias [D.W. Heilman, J.G. Teodoro, M.R. Green, Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-
25 specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies, *J. Virol.* 80 (2006) 7535-7545; I.K.H. Poon, C. Oro, M.M. Dias, J. Zhang, D.A. Jans, Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in
30 normal but not in tumor cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 7059-7064.]. Dados recentes ligam o seu complexo modo de ação a várias proteínas celulares, as quais possuem papel

determinante no ciclo de proliferação celular e morte celular.

A proteína VP3 não apresenta homologia de seqüência com nenhuma proteína celular conhecida [M.H. Noteborn, G.F. de Boer, D.J. van Roozelaar, C. Karreman, O. Kranenburg, J.G. Vos, S.H. Jeurissen, R.C. Hoeben, A. Zantema, G. Koch, et al., Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle, *J. Virol.* 65 (1991) 3131-3139]. A região C terminal da VP3 contém uma sequência de localização nuclear (NLS) e um potencial sinal de exportação nuclear (NES). Estas seqüências de reconhecimento dirigem a VP3 para dentro e para fora do núcleo celular. A forma biologicamente ativa da VP3 pode formar multímeros que consistem de 30 a 40 monômeros. A região C terminal de cada monômero contém um NLS com sítio de fosforilação acessível, o que permite a sua interação com outras proteínas e a sua modificação por kinases. A microinjeção de multímeros da VP3 no citoplasma de células tumorais revelou que os complexos são translocados ao núcleo celular, resultando em morte celular por apoptose [S.R. Leliveld, Y.H. Zhang, J.L. Rohn, M.H. Noteborn, J.P. Abrahams, Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9042-9051]. Tem sido demonstrado que a VP3 foi indutora de apoptose em diversos células de origem tumoral de humanos, incluindo melanoma, hepatoma, linfoma, colangiocarcinoma, carcinoma de cólon, tumor de mama e pulmões e outros [C. Backendorf, A.E. Visser, A.G. de Boer, R. Zimmerman, M. Visser, P. Voskamp, Y.H. Zhang, M. Noteborn, Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 143-169; M. Tavassoli, L. Guelen, B.A. Luxon, J. Gäken, Apoptin: specific killer of

tumor cells? Apoptosis 10 (2005) 717-72]. De fato, atualmente mais de 70 linhagens de células tumorais foram suscetíveis à ação da VP3, enquanto que esta não causa apoptose em células normais tais como células humanas endoteliais, hepatócitos e células tronco hematopoiéticas. Assim, a atividade da VP3 parece ser dependente do estado transformado da célula [C. Backendorf, A.E. Visser, A.G. de Boer, R. Zimmerman, M. Visser, P. Voskamp, Y.H. Zhang, M. Noteborn, Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48 (2008) 143-169]. A VP3 também causou apoptose em células imortalizadas *in vitro*, sendo que há somente um artigo demonstrando a sua atividade em células não tumorais e, mesmo assim, estas são culturas secundárias, e não primárias de fibroblastos de feto humano [A.A. Danen-Van Oorschot, D.F. Fischer, J.M. Grimbergen, B. Klein, S. Zhuang, J.H. Falkenburg, C. Backendorf, P.H. Quax, A.J. Van der Eb, M.H. Noteborn, Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 5843-5847; Y.H. Zhang, P.J. Abrahams, A.J. van der Eb, M.H. Noteborn, The viral protein Apoptin induces apoptosis in UV-C-irradiated cells from individuals with various hereditary cancer-prone syndromes, Cancer Res. 59 (1999) 3010-3015; L. Guelen, H. Paterson, J. Gaken, M. Meyers, F. Farzaneh, M. Tavassoli, TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells, Oncogene 23 (2004) 1153-1165]. Estes experimentos levantam a possibilidade de a VP3 afetar seletivamente células normais em estado embriônico, mas não em células de adultos. A inoculação intratumoral da proteína recombinante VP3 em camundongos com implante de células tumorais de hepatoma humano reduz o

crescimento tumoral e induz a regressão tumoral em uma semana após a inoculação [A.M. Pietersen, M.M. van der Eb, H.J. Rademaker, D.J. van den Wollenberg, M.J. Rabelink, P.J. Kuppen, J.H. van Dierendonck, H. van Ormondt, D. Masman, C.J. van de Velde, A.J. van der Eb, R.C. Hoeben, M.H. Noteborn, Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene, *Gene Ther.* 6 (1999) 882-892]. O uso combinado da VP3 com outras drogas quimioterápicas leva a uma redução tumoral mais dramática do que o observado quando ou a VP3 ou o quimioterápico são administrados isoladamente [S.J. Olijslagers, Y.H. Zhang, C. Backendorf, M.H. Noteborn, Additive cytotoxic effect of apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 100 (2007) 127-131].

Os mecanismos de indução de morte celular pela VP3 não estão esclarecidos, embora haja consenso sobre alguns eventos moleculares. Um dos aspectos chave é a habilidade da proteína de induzir apoptose de forma independente da proteína p53, a qual é uma proteína celular supressora de tumores e está envolvida na indução de apoptose celular. Assim, a VP3 induz apoptose em células tumorais que expressam ou não a p53.

Além disto, sabe-se que a apoptose é tipicamente mediada por proteínas celulares chamadas de caspases, que iniciam e executam o processo de apoptose [M. Los, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff, The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice, *Immunity* 10 (1999) 629-639; C. Schwerk, K. Schulze-Osthoff, Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing, *Mol. Cell* 19 (2005) 1-13]. Recentemente foi demonstrado que a expressão da VP3 resulta na ativação de caspases celulares (Burek et al.,).

A toxicidade seletiva da VP3 é atribuída principalmente à sua localização celular. Foi demonstrado que em células normais a proteína é expressa no citoplasma, enquanto ela se acumula no núcleo de células transformadas [A.A. Danen-Van Oorschot, Y.H. Zhang, S.R. Leliveld, J.L. Rohn, M.C. Seelen, M.W. Bolk, A. Van Zon, S.J. Erkeland, J.P. Abrahams, D. Mumberg, M.H. Noteborn, Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27729-27736]. A localização desta proteína é determinada pela presença de NLS e NES, os quais interagem com proteínas celulares para fazer a importação ou exportação de proteínas para e do núcleo celular [I.K. Poon, C. Oro, M.M. Dias, J.P. Zhang, D.A. Jans, A tumor cell-specific nuclear targeting signal within chicken anemia virus VP3/Apoptin, *J. Virol.* 79 (2005) 1339-1341; J.L. Rohn, M.H. Noteborn, The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes, *Apoptosis* 9 (2004) 315-322]. Entretanto, não se conhece qual ou quais são as proteínas expressas especificamente em células tumorais que efetivamente reconhecem o NLS da VP3 para encaminhá-la ao núcleo celular [Poon IK, Jans DA. Regulation of nuclear transport: Central role in development and transformation? *Traffic* 2005, 5, 173-86].

A habilidade da VP3 de induzir apoptose de forma independente da p53 traz um incrível potencial farmacológico. Este aspecto da função da proteína podem ser diretamente empregados na terapia anti tumoral. Além disto, a possibilidade de direcionar a ação da VP3 pode ser uma abordagem para alcançar especificidade tumoral e desenhar novas alternativas de tratamento de tumores.

A via de liberação da VP3 em tumores é um assunto em discussão. A indução de apoptose em cultivos celulares ou

tumores induzidos em camundongos podem ser obtidos pela inoculação de vetores virais expressando VP3 (adenovírus, poxvirus), superexpressão transitória ou por conjugação da VP3 com proteínas reconhecidas por receptores celulares
5 específicos [C. Backendorf, A.E. Visser, A.G. de Boer, R. Zimmerman, M. Visser, P. Voskamp, Y.H. Zhang, M. Noteborn, Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 143-169; A.M. Pietersen, M.M. van der Eb, H.J.
10 Rademaker, D.J. van den Wollenberg, M.J. Rabelink, P.J. Kuppen, J.H. van Dierendonck, H. van Ormondt, D. Masman, C.J. van de Velde, A.J. van der Eb, R.C. Hoeben, M.H. Noteborn, Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene, *Gene Ther.* 6 (1999) 882-892; X.
15 Li, N. Jin, Z. Mi, H. Lian, L. Sun, X. Li, H. Zheng, Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin in vivo and in vitro, *Int. J. Cancer* 119 (2006) 2948-2957; D.J. Peng, J. Sun, J.Y.Z.Wang, J. Tian, Y.H. Zhang, M.H. Noteborn, S. Qu, Inhibition of hepatocarcinoma by
20 systemic delivery of Apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor, *Cancer Gene Ther.* 14 (2007) 66-73]. Ainda, outro aspecto farmacológico a ser explorado é a indução de acúmulo de VP3 no núcleo celular para tentar potencializar a atividade anti-tumoral da VP3.

25 A proteína VP3, ou apoptina, do CAV é atualmente estudada por suas propriedades anti-tumorais [Los M, Panigrahi S, Rashedi I, Mandal S, Stetefeld J, Essmann F, Schulze-Osthoff K. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochim Biophys Acta.* 1793 (2009) 1335-1342].

30 A proteína VP3 do CGV2 tem apenas 30% de similaridade com a proteína VP3 do CAV. Por isso, possui, provavelmente, diferentes propriedades anti-tumorais. Por exemplo, a VP3 do

CGV2 tem dois sinais de localização no núcleo, um deles exatamente na sua região ao C-terminal. A proteína VP3 de CGV2 não tem neste local suficientes resíduos K ou R para formar um sinal de localização [S. Maddika, F.J. Mendoza, K. Hauff, C.R. Zamzow, T. Paranjothy, M. Los, Cancerselective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action, Cancer Biol. Ther. 5 (2006) 10-19] no núcleo e provavelmente esta região de VP3 de CGV2 não funciona da mesma forma que a VP3 do CAV. Este aspecto pode influenciar o acúmulo de VP3 no núcleo celular e conseqüentemente o seu efeito anti-tumoral.

Sumário da Invenção

Pequenas moléculas circulares de DNA de fila única, como o genoma de CGV2, podem ser amplificadas pela Phi29 DNA polimerase sem qualquer conhecimento prévio sobre a sua seqüência de nucleotídeos. Os produtos de amplificação são de DNA da fita dupla e podem ser digeridos com enzimas de restrição adequadas e clonados em vetores de procariotos. Algumas enzimas cortam o genoma uma vez só e estes produtos podem ser isolados e re-circularizados. Já que, como outros vírus da família *Circoviridae*, o CGV2 tem uma forma de replicação de fita dupla, esta forma do genoma CGV2 pode ser transfectada em células eucarióticas adequadas, dando origem aos vírus CGV2 com todas as suas propriedades biológicas. Os inventores do presente pedido de patente usam a amplificação com Phi29 DNA polimerase e métodos do transfecção para isolar o vírus CGV2.

Os presentes inventores caracterizaram a forma de fita dupla do genoma inteiro do CGV2. Este genoma tem um comprimento de cerca 2,4 kb e está clonado em vetores procariotos como o pCR2.1. O DNA foi parcialmente seqüenciado (SEQ ID NO: 1). Em um teste de PCR específico para ácidos

nucléicos de CGV2, este foi demonstrado no fígado, baço, rim e folículos de penas de galinhas doentes.

A análise de produtos de amplificação da Phi29 DNA polimerase de quatro amostras diferentes isoladas de campo
5 mostrou que o genoma do CGV2 clonado é representante do CGV2 de campo. Todos eles tinham um tamanho de genoma de cerca 2,4 kb e digestões com outras enzimas de restrição mostraram o mesmo padrão para todos os quatro isolados. Em experimentos de PCR usando oligonucleotídeos derivados da seqüência CGV2
10 (SEQ ID NO: 1) o DNA do CGV2 foi amplificado especificamente.

Descrição Breve das Figuras

FIG. 1 mostra os produtos de amplificação da Phi29 DNA polimerase de quatro soros diferentes de galinhas doentes
15 digeridos com BamHI.

FIG. 2 mostra um mapa de restrição enzimática do genoma CGV2 clonado e as posições das principais regiões com uma fase de leitura aberta (ORFs): VP1, VP2 e VP3.

FIGS. 3A, 3B, 3C e D mostram as semelhanças de
20 aminoácidos encontradas entre as proteínas codificadas de CGV2: VP1, VP2 e VP3 e aquelas dos CAV e D: Regiões funcionais possíveis da proteína CGV2 VP3

FIG. 4 mostra a construção de um mutante VP3 negativo de CGV2.

25 FIG. 5 mostra a construção de um vetor de expressão eucariótica para CGV2 VP3

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção fornece informação específica sobre
30 a seqüência de nucleotídeos correspondentes à, ou complementares, à seqüência de nucleotídeos de um genoma de CGV2. A modalidade preferida da presente invenção consiste na

tal seqüência de nucleotídeos de CGV2 especificamente correspondente à, ou complementar, à seqüência de nucleotídeos SEQ ID NO: 1, uma mesma seqüência de nucleotídeos semelhantes a pelo menos 70%, ou parte dele. A

5 invenção consiste de uma molécula de ácido nucléico ou fita simples ou dupla fita, ou DNA ou RNA, linear ou circular, nuas ou envolvidas em partículas, ou parte de um vetor procariótico ou eucariótico que contém estes ácidos nucléicos.

10 Uma característica importante da invenção é uma molécula de ácido nucléico, que pode incluir o genoma completo de CGV2, mas este não é necessariamente o caso. Muitas vezes, apenas uma parte específica de seqüências de CGV2 são suficientes para a aplicação necessária.

15 Uma primeira possibilidade preferida é uma seqüência de nucleotídeos específicos do CGV2 correspondendo a, ou complementar, a uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína de CGV2 e que ocorre em um genoma de CGV2, ou parte dele. A expressão "parte", em princípio, compreende

20 todas as partes que ainda podem ser designadas como CGV2-específicas. Ao nível de proteína este será um epítopo para a maioria das aplicações, ou seja, um determinante antigênico reconhecido por anticorpos ou uma proteína biologicamente funcional ou parte de uma proteína.

25 Em um segundo aspecto, a invenção compreende o uso da informação genética recombinante como definido acima, em especial para fins de diagnóstico, imunização, para fins de vacinação, ou para a produção de proteínas do CGV2 (biologicamente ativas). Mais especificamente, trata-se, por

30 exemplo, da utilização da informação genética de recombinação de acordo com a invenção como uma sonda CGV2-específica ou *oligonucleotídeo* em um processo para detectar ácidos

nucléicos de CGV2 amplificados através de RNA por meio de RT-PCR ou amplificados de DNA por meio de PCR. Em particular, a invenção se refere a um kit de diagnóstico contendo informações genéticas recombinantes de acordo com a invenção,
5 como uma sonda CGV2-específica ou *oligonucleotídeo*.

Outra característica importante da invenção é a utilização da informação genética recombinante de acordo com a invenção de uma vacina de vírus vivo, baseada em um vírus do tipo selvagem CGV2 ou em um recombinante CGV2 mutante, e
10 realizar a proteção contra a infecção e doença causada por CGV2 ou um patógeno relacionado. A invenção também se estende a uma preparação da vacina para imunizar contra CGV2 ou patógenos relacionados, que compreende a preparação da informação genética recombinante de acordo com a invenção e,
15 opcionalmente, um ou vários adjuvantes adequados para vacinas de vírus vivos.

Outro aspecto da invenção está relacionada a proteínas de CGV2 ou parte de informações obtidas por recombinação genética de acordo com a invenção, compreendendo uma
20 seqüência de nucleotídeos que codifica a proteína CGV2 ou parte dela, assim como a proteína CGV2 ou de parte dela obtida pelo isolamento de células procarióticas ou eucarióticas recombinantes contendo informações genéticas de acordo com a invenção, compreendendo uma seqüência de
25 nucleotídeos que codifica proteínas de CGV2 ou partes dele e é capaz da expressão da mesma.

Também no nível de proteína a invenção estende-se a diferentes aplicações, nomeadamente: a utilização de uma proteína de CGV2 ou parte de proteínas de acordo com a
30 invenção para a terapia anti-tumoral ou para fins de diagnóstico, imunização ou para fins de vacinação, ou para a

produção de anticorpos CGV2-específicos, tanto policlonais como monoclonais.

Por exemplo, a invenção prevê a utilização de uma proteína de CGV2 ou partes dela como definido acima como reagente para ligar anticorpos CGV2 - específicos em um processo de imunoenensaio para a detecção de anticorpos CGV2 - específicos, por exemplo, um ensaio de imunoperoxidase, um ELISA ou imunofluorescência, e um kit de diagnóstico para a detecção de anticorpos CGV2 - específicos em um imunoenensaio, como coloração por imunoperoxidase, um ELISA ou de imunofluorescência indireta, um kit de diagnóstico onde uma proteína CGV2 ou parte de proteínas de acordo com a invenção, como um reagente que liga anticorpos CGV2 - específicos.

A invenção também inclui a utilização de uma proteína CGV2 ou parte de proteínas, tal como definido anteriormente, como uma vacina de subunidade para fornecer proteção contra CGV2, bem como uma preparação de vacina contra CGV2, que compreende uma preparação de proteínas do CGV2 ou parte de proteínas de acordo com a invenção e, opcionalmente, um ou vários adjuvantes apropriados para as vacinas de subunidade. A utilização de uma proteína de CGV2 ou da proteína como acima definido em um processo para produzir anticorpos policlonais ou monoclonais CGV2 específicos também se insere na esfera de aplicação da invenção.

Em outra característica, a invenção também se refere a anticorpos específicos anti CGV2 produzidos por meio de uma proteína CGV2 ou parte de proteínas, tal como definido anteriormente, bem como os diferentes usos para CGV2 como anticorpos específicos, por exemplo, para fins de diagnóstico, imunização ou fins de vacinação, ou para fins de preparação de proteínas em larga escala. Por exemplo, um kit de diagnóstico para a detecção de proteínas CGV2 em um

processo de imunoensaio, como um kit de diagnóstico CGV2 que contém anticorpos específicos de acordo com a invenção, como a proteína de CGV2 reagentes.

Outro aspecto importante da invenção é o uso de
5 proteínas de CGV2 ou suas partes, especialmente da proteína VP3 do CGV2 ou partes dela, como uma molécula biologicamente ativa, especificamente na sua utilização em uma terapia anti-tumoral. Tal aplicação inclui a proteína VP3 isolada, mas também a proteína expressa em um vetor eucarioto. Estes
10 vetores podem expressar a proteína VP3 do CGV2 completa, sozinha ou como parte de uma proteína de fusão, tanto em sua forma original ou de uma forma mutante.

Materiais e Métodos

15 Isolamento de DNA de soros de frangos

Isolamento de DNA de soros de frango é feito da seguinte forma: 500 µl de soro de frango é digerido por 1:30 h a 37°C em 520 µl tampão de lise (0,3% SDS e 0,1 mg de proteinase K). O DNA é extraído primeiro com 500 µl de fenol saturado
20 seguido por uma extração de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1). Após a precipitação com 2,5 volumes de etanol 98% frio, o sedimento é lavado com uma solução de etanol / água de 70%. A parte restante é suspensa em 50 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) suplementado com 10 mg RNase e incubada
25 por 30 min a 37°C.

Isolamento de DNA de tecidos de frango

O isolamento de DNA de tecidos de frango (cérebro, fígado, baço, rim, folículo da pena), é feito essencialmente como descrito por Van Engelenburg et al. [Van Engelenburg et
30 al. 1993. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. Journal of Clinical Microbiology 31, 3129-

3135], com as seguintes alterações; 10 mg de tecido são macerados e digeridos por 4 h, a 37°C em 1 ml de tampão de lise (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) contendo 0,5% SDS e 0,1 mg de proteinase K. O DNA é extraído por duas vezes com
5 fenol: clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com dois volumes de etanol 100% e mantido a 20°C por 1 h. O DNA é lavado em etanol 70%, o ar seco e ressuspensão em 100 µl de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4).

10 Multiple-primed rolling-circle amplification (MPRCA) de genomas do CGV2

As amostras de DNA isoladas de soros e os tecidos são submetidas a *multiple-primed rolling-circle amplification* (MPRCA) usando a phi29 DNA polimerase. O protocolo MPRCA é desenvolvido, essencialmente, como é descrito por Dezen et
15 al. 2009 [Dezen et al. (2009) Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation. Research in Veterinary Science]. Um total de 100 ng de DNA extraído é usado em um volume de reação de 25 µl. Os produtos da reação
20 MPRCA são separados digeridos ou não-digeridos com enzimas de restrição em um gel de agarose 0,7%.

Clonagem do DNA de CGV2

Os produtos da digestão de genomas de CGV2 amplificados com enzimas de restrição que dão origem à só um ou dois
25 fragmentos são clonados em vetores procariotos, como pCR2.1, e submetidos à análise da seqüência. Partes do genoma do DNA do CGV2 são subseqüentemente sub-clonadas no mesmo vetor ou, por exemplo, em pUC18/19. Todos os passos de clonagem do plasmídeo de DNA são realizados utilizando métodos padrão
30 [Sambrook, J., Russell, DW, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 1, 3rd ed. Spring Harbour Laboratory Press, New York, E.U.A., pp. 1,84-1,87].

Análise da sequência de DNA CGV2

Plasmídeos contendo fragmentos do genoma do CGV2 são purificados pelo método padrão 'miniprep' e cerca de 100 ng de cada plasmídeo é utilizado para a análise da sequência de nucleotídeos em um aparelho de seqüenciamento automático multicanal (ACTGene256-Mega Base), utilizando oligonucleotídeos M13 de padrão ou oligonucleotídeos específicos para o genoma do CGV2. As seqüências obtidas são alinhadas em um programa de montagem de seqüências, como o programa SeqMantmII 500 de DNASTAR Inc. e estudadas utilizando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402] do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Culturas de células

O vírus CGV2 é propagado em células da linhagem T de frango transformadas pelo vírus da doença de Marek (MDCC-MSB1) ou em fibroblastos de embrião de galinha (CEF) transformadas com um vetor de expressão que expressa um oncogene como o Simian Virus Vacuolizante Tag40 (SV40 Large T antigen), o gene da telomerase de camundongo (tert gene) ou o gene E7 do vírus do papiloma humano.

Transfecção de genomas de CGV2

Para a transfecção de genomas de CGV2 re-circularizados em células de galinha transformadas, um dos dois métodos seguintes são utilizados: o método de fosfato de cálcio de Graham e Van der Eb [Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456 - 467], ou o método lipofectamine [Lipofectaminetm 2000 da Invitrogen]. Em suma,

para transformar células de galinha, 1 µg de DNA genômico re-circularizado do CGV2 é adicionado às células usando um dos métodos mencionados acima e as células transfectadas são incubadas em uma incubadora de CO₂ a 37°C. Em seguida, o sobrenadante das células transfectadas e não transfectadas é testado para a presença de genomas de CGV2 por 5 dias consecutivos com o PCR específico para CGV2 para acompanhar o crescimento do vírus e por um ensaio de imunoperoxidase em monocamada (IPMA) das células transfectadas após 5 dias de cultivo.

Reação em cadeia da polimerase (Sigla inglês: Polymerase Chain Reaction (PCR)).

Oligonucleotídeos para executar uma reação de PCR serão comprados de uma empresa comercial e sua seqüência de nucleotídeos será baseada na seqüência SEQ ID NO 1. O DNA é ou isolado de soros, ou de vários tecidos de frangos doentes ou a partir do sobrenadante das células transfectadas com genomas de CGV2. A reação de PCR é realizada em um volume total de 25 µl contendo 2,5 µl tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,75 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação são: 7 min a 94°C seguidos por 35 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 62°C e 30 seg. a 72°C, seguido por 7 min a 72°C em um termociclador Eppendorf Master. Um quinto do DNA amplificado é analisado em um gel de 1% agarose.

Teste da imunoperoxidase em monocamada (IPMA)

Células transfectadas com genomas de CGV2 ou infectadas com vírus e células negativas são, depois de três a cinco dias de cultivo, são coradas utilizando soros de galinhas positivas para CGV2 em um teste de imunoperoxidase em monocamada [em inglês: immunoperoxidase monolayer assay

(IPMA)]. O ensaio IPMA é realizado de acordo com o método descrito por Wensvoort et al. [Wensvoort, G., C. Terpstra, J. Boonstra, M. Bloemraad, and D. Van Zaane. 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use
5 in laboratory diagnosis. Vet.Microbiol. 12:101-108]. Um substrato insolúvel cromogênico, 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma) é usado para a reação da peroxidase.

Teste de vírus neutralização

Para estudar a resposta imune do hospedeiro anti-CGV2,
10 um teste de detecção de anticorpos neutralizantes específicos contra CGV2 é realizado utilizando essencialmente o teste de vírus neutralização (VNT) de Deregt et al. [Deregt D., Cho H.J.C. & Kozub G.C. 1993. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine
15 herpesvirus-1 antibodies. Canadian Journal of Veterinary Research. 57:56-59.] Em suma, o vírus CGV2 (100 TCID₅₀ por poço) em microplacas de 96 poços são pré-incubados por 24 horas a 37°C, com uma série de diluições de soros de frangos e transferidos para uma segunda microplaca com células
20 suscetíveis ao CGV2. Após 3 dias a 37°C em uma incubadora de CO₂, as células infectadas são examinadas microscopicamente para ECP e / ou coradas utilizando o ensaio de IPMA. O título do soro é tomado como a recíproca da maior diluição que dá a inibição completa do ECP / ou células positivas para CGV2.

A infecção de galinhas com o vírus CGV2

Sobrenadantes de células transfectadas com DNA de CGV2 e
sobrenadantes de células não transfectadas são injetadas por
via intramuscular em pelo menos 18 pintos de um dia (9
infectados + 9 não infectados). Seis dias depois de infecção
30 uma necrópsia é realizada de 3 + 3 frangos por grupo. O peso corporal é medido e fluidos corporais (sangue com heparina, líquido, medula óssea, e fezes) são recolhidos. Para isolar o

vírus e realizar imunohistoquímica, timo, baço, rim, e amostras do cérebro são coletados. Das amostras coletadas o DNA é extraído e submetido à PCR para identificação de DNA de CGV2. Os exames imunohistoquímicos são feitos por meio de uma
5 coloração por imunoperoxidase com soros de frango positivos para CGV2. O mesmo procedimento é repetido em 12 e 18 dias após a infecção.

Exemplos

10 Exemplo 1

Amplificação de genomas de CGV2 com Phi29

As amostras de DNA isoladas de soros de galinhas doentes foram submetidas à multiple-primed rolling-circle amplification (MPRCA) usando a Phi29 DNA polimerase e
15 oligonucleotídeos DNase resistentes com seqüências aleatórias. Soros controles negativos de galinhas saudáveis foram usados para controle negativo. Um total de 100 ng de DNA extraído foi usado como molde em um volume de reação de 25 mL. Os produtos da reação MPRCA foram separados em um gel
20 de agarose a 0,7%, após a digestão com HindIII ou ApaI. Apenas um fragmento de aproximadamente 2,4 kb surgiu e após a digestão com BamHI dois fragmentos de, respectivamente, 0,6 kb e 1,8 kb apareceram. Produtos de amplificação com Phi29 de
25 quatro amostras diferentes de galinhas doentes foram comparados e os quatro apresentaram o mesmo padrão de fragmentos BamHI. (Figura 1) A identidade desses fragmentos foi confirmada pela análise da seqüência (dados não mostrados).

Exemplo 2

30 *Clonagem e sub-clonagem da forma de fita dupla do DNA de CGV2 em vetores bacterianos*

Os fragmentos BamHI de 0,6 kb e 1,8 kb foram isolados do gel de agarose e ligados no vetor de procariotos pCR2.1 digerido com a enzima correspondente. A mistura da ligação foi usada para transformar células de *E. coli* Top10 e colônias resistentes à ampicilina foram isoladas e testadas para as moléculas recombinantes que têm um inserto de 0,6 ou 1,8 kb. Os plasmídeos com inserções de DNA de CGV2 foram usados para determinar a seqüência de nucleotídeos da inserção e foram usados para sub-clonar fragmentos. Subclones também foram submetidos à análise de seqüenciamento de nucleotídeos

Exemplo 3

A análise da seqüência de nucleotídeos do genoma CGV2

A seqüência de nucleotídeos das inserções dos fragmentos sub-clonados foi determinada usando um aparelho de seqüenciamento automático aplicando o método de interrupção da cadeia de Sanger et al. [Sanger, et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 74:5463-5467] Os oligonucleotídeos utilizados foram o M13-forward ou M13-reverse ou oligonucleotídeos CGV2-específicos baseados em SEQ ID NO: 1. As seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas com seqüências do banco de dados NCBI usando o programa BLAST e um grau baixo (mais ou menos 40%), da similaridade da seqüência de aminoácidos foi encontrado com proteínas codificadas pelo vírus da anemia das galinhas (CAV). Estudando as regiões da seqüência com fases de leitura aberta com o programa DNASTAR um conjunto de três regiões de proteínas codificantes, semelhante à organização do genoma do CAV, pode ser discernido: a região VP3 que se sobrepõe a uma região VP2 e a região de VP2 também se sobrepõe a uma parte da região da VP1 (Figura 2). As seqüências de aminoácidos das três proteínas virais (VPs), obtidas após a tradução

conceitual da seqüência de nucleotídeos, são dadas em SEQ ID NO 2, 3 e 4. As identidades de resíduos de aminoácidos das proteínas VP1 de CGV2 com as do CAV são: (parcial) VP1: 34,3%; VP2: 40,3% e VP3: 32,2%. (Figura 3).

5 Exemplo 4

Reação da polimerase em cadeia (PCR) do DNA de CGV2 de isolados de campo.

Um par de oligonucleotídeos foi concebido com base na SEQ ID NO. 1 para realizar uma reação da polimerase em cadeia
10 (PCR) específica para o CGV2. As seqüências desses oligonucleotídeos são 5' GGTAGAAGCCAAAGCGTCCAC 3' e 5' CGTGTCCGCCAGCAGAAAC 3'. O produto amplificado tem um tamanho de 346 pb. A PCR com estes oligonucleotídeos sintéticos foi realizada especificamente para detectar o DNA de CGV2 em
15 galinhas no campo. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µl contendo 2,5 µl tampão 10x de PCR (Invitrogen), 0,75 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação são: 7 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 62°C e 30 seg. a 72°C, seguidos por 7 min a 72°C em um termociclador Eppendorf Master. Um quinto do DNA amplificado foi analisado em um gel de agarose 1%.

Para determinar o limite inferior de detecção da PCR
25 CGV2 específica, 50 ng do produto da PCR de 346 pb foram submetidos a uma série de diluições na base 10 e as alíquotas de todos os passos da diluição foram utilizadas como moldes de novas reações de PCR. A amostra com menor concentração de DNA que ainda deu origem a um produto de PCR detectável
30 continha cerca de 1000 moléculas de DNA do CGV2. Usando este PCR, DNA de CGV2 pode ser demonstrado no fígado, baço, rim e folículos de penas de galinhas doentes

Exemplo 5*Construção de um mutante de CGV2 VP3 negativo*

Para construir um mutante de CGV2 que não expressa a proteína VP3, um códon de parada foi introduzido no início da região codificando a proteína VP3. Este codon de parada deve ser concebido de forma que a região que codifica a proteína VP2 não é afetada. O primeiro aminoácido que foi alterado assim foi o resíduo de leucina número 18 da VP3. O resíduo isoleucina da proteína VP2 na mesma posição do genoma não foi afetado por essa mudança (Figura 4).

Para introduzir esta mutação no genoma de CGV2 uma PCR de fusão foi executada. Para isto quatro oligonucleotídeos foram desenhados parcialmente com base na SEQ NO 1, como segue: dois oligonucleotídeos complementares abrangendo a mutação desejada: 5' CTCGGTCAGAACTATAAACGCATACGAG 3' e 5' CTCGTATGCGTTtATAGTTCTGACCGAG 3' e dois oligonucleotídeos externos que são localizados de tal forma que a região amplificada pode ser clonada facilmente no genoma de CGV2. Um oligonucleotídeo está localizado fora do sítio ApaI e um oligonucleotídeo inclui o sitio de HindIII e é baseado na seqüência do vetor (M13) incluindo um sitio de EcoRI (EcoRI não corta o genoma de CGV2). Figura 4. As duas primeiras PCRs amplificaram a parte esquerda e a parte direita incluindo a região alterada. Uma terceira PCR foi feita utilizando as duas regiões amplificadas como moldes e apenas os dois oligonucleotídeos externos para fundir as duas metades e amplificar a região completa ApaI - HindIII/EcoRI. A região ApaI - HindIII/EcoRI mudada foi clonada em um clone do genoma total do CGV2, clonado no sítio HindII, a partir do qual a versão do tipo selvagem da região ApaI - HindIII/EcoRI foi removida.

Exemplo 6

Expressão da VP3 de CGV2 em eucariotos

Todas as proteínas CGV2 podem ser produzidas usando sistemas de expressão de procariotos ou eucariotos. O conhecimento sobre as regiões codificantes do CGV2 é

5 suficiente para utilizar tais regiões para clonagem em um vetor de expressão adequado. Existem vários sistemas de expressão bacterianos disponíveis. Para expressão em eucariotos os sistemas de baculovírus e de levedura são atualmente os mais comuns. Para fornecer uma proteína à uma

10 célula hospedeira, vetores virais, tais como vetores retrovirais, adenovírus, baculovírus pseudo-tipo podem ser usados. Neste exemplo, mostramos a expressão da proteína VP3 em um vetor de expressão eucarioto para testar a sua função de apoptose e / ou para produzir células complementando a

15 replicação de mutantes de CGV2 VP3 mutantes negativos. A região codificante da VP3 do CGV2 é isolada de um sub-clone do fragmento 1,8 kb BamHI por digestão com ApoI e BamHI. Depois de separar o material digerido em um gel de agarose a 0,7%, o fragmento BamHI - ApoI de 0,4 kb foi isolado do gel

20 e utilizado em uma reação de ligação com o plasmídeo pcDNA3-IRES-GFP-NLS digerido com BamHI e EcoRI. Um plasmídeo recombinante tendo a região desejada de 0,4 kb da VP3 do CGV2 foi isolado e usado para a transfecção de células transformadas ou não-transformadas para o estudo do seu

25 efeito sobre a apoptose. As colônias de células expressando GFP estavelmente no núcleo podem ser isoladas para obter a VP3 do CGV2 expressa.

REIVINDICAÇÕES

1. A clonagem do DNA do Gyrovírus das galinhas tipo 2, caracterizado por compreender seqüências de nucleotídeos que codificam polipeptídios relacionados ao CGV2.

2. Uma seqüência de nucleotídeos de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por codificar uma seqüência de pelo menos uma parte dos polipeptídios:

a. que apresenta uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade maior do que 70%;

b. que apresenta uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade maior do que 70%;

c. que apresenta uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 4 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade maior do que 70% ; e equivalentes funcionais das mesmas.

3. Uma seqüência de nucleotídeos caracterizada por compreender pelo menos parte do genoma do CGV2.

4. Uma seqüência de nucleotídeos de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por conter pelo menos parte da seqüência de nucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade maior do que 70%.

5. Uma molécula de uma seqüência de nucleotídeos recombinante caracterizada por uma seqüência de nucleotídeos de acordo com reivindicações 1-4.

6. Uma molécula de uma seqüência de nucleotídeos recombinante de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por ser funcionalmente ligada a uma seqüência de controle de expressão.

7. Um vetor viral caracterizado por conter uma seqüência de nucleotídeos de acordo com as reivindicações 1-4.

8. Uma célula hospedeira transformada com uma seqüência de nucleotídeos de acordo com as reivindicações 1-4 ou uma
5 molécula de nucleotídeos recombinante de acordo com as reivindicações 5-6 ou que contenham um vetor viral de acordo com a reivindicação 7.

9. Um polipeptídio com características imunogênicas de um antígeno relacionado ao CGV2.

10 10. Um polipeptídio de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por conter pelo menos parte da seqüência de aminoácidos:

a. Tendo uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade
15 maior do que 70%;

b. Tendo uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade maior do que 70%;

c. Tendo uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID
20 NO: 4 ou uma seqüência similar de aminoácidos com identidade maior do que 70% ; e equivalentes funcionais das mesmas.

11. Um polipeptídio relacionado a CGV2 e codificado por uma seqüência de nucleotídeos de acordo com as reivindicações 1-4, caracterizado por ter identidade de nucleotídeos maior
25 do que 70%.

12. Um anticorpo ou anti-soro imunorreativo a um polipeptídio de acordo com as reivindicações 9-11.

13. Um CGV2 atenuado que não ocorre na natureza, caracterizado por ser obtido como resultado de uma mutação no
30 genoma do CGV2 introduzida por técnicas de DNA recombinante.

14. Uma vacina para a proteção das galinhas e outras aves (como perus, emas, avestruz, faisão, patos, gansos e

codornas) contra uma infecção por CGV2, caracterizada por ser composta por: uma molécula de uma seqüência de nucleotídeos recombinante de acordo com a reivindicação 5 (ou uma parte dela, com no mínimo 36 nucleotídeos), um vetor viral de acordo com a reivindicação 6, uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 8, um polipeptídeo de acordo com as reivindicações 9 -11 ou um CGV2 de acordo com a reivindicação 11.

15. Um método para a preparação de uma vacina contra uma infecção por CGV2, caracterizado por ser uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7 é cultivada, e conseqüentemente o material contendo CGV2 é recolhido e tratado em uma preparação farmacêutica com atividade imunizante.

16. Um método para a preparação de uma vacina contra CGV2, caracterizado por um polipeptídeo (mínimo 12 aminoácidos), de acordo com as reivindicações 9-11, ser processado em uma preparação farmacêutica com atividade imunizante.

17. Um método para a proteção das galinhas contra infecção por CGV2, caracterizado por uma quantidade eficaz de uma vacina de acordo com a reivindicação 14 que é administrada aos animais.

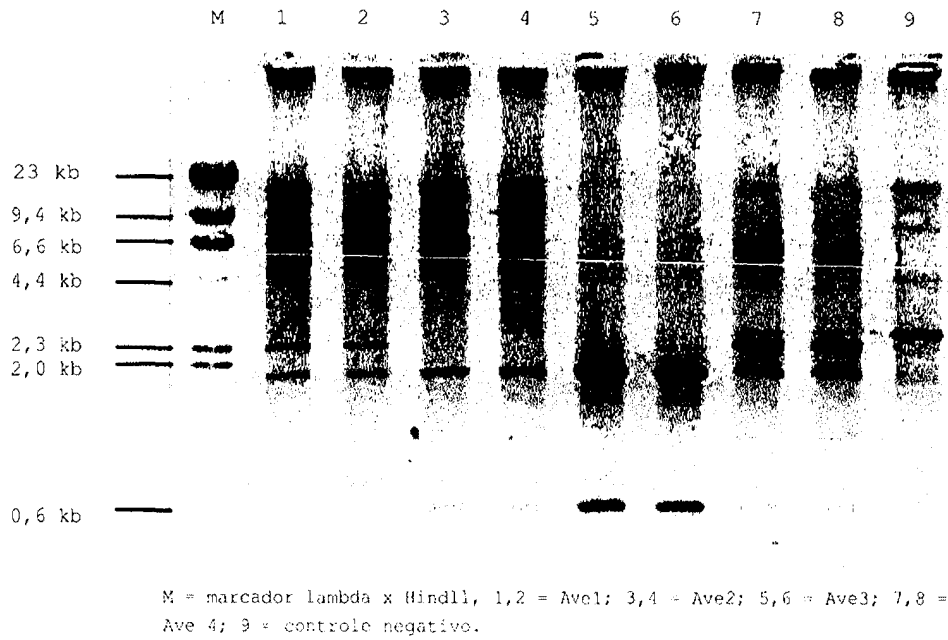
18. Um reagente imunológico caracterizado por compreender um polipeptídeo (mínimo 12 aminoácidos) de acordo com as reivindicações 9-11.

19. Um kit para a realização de um imunoenensaio caracterizado por compreender um reagente imunológico de acordo com a reivindicação 18.

20. Uma molécula de nucleotídeos recombinante caracterizada por compreender uma seqüência de ácido nucléico para expressar pelo menos parte (mínimo 12 aminoácidos) da

seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4 ou equivalentes funcionais utilizados para terapia anti-câncer.

21. Uma proteína ou pelo menos parte (mínimo 12 aminoácidos) da seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4
5 separadamente ou parte de uma proteína de fusão ou equivalentes funcionais utilizados para terapia anti-câncer.

FIGURAS**Figura 1****Figura 2**

Genoma de CGV2

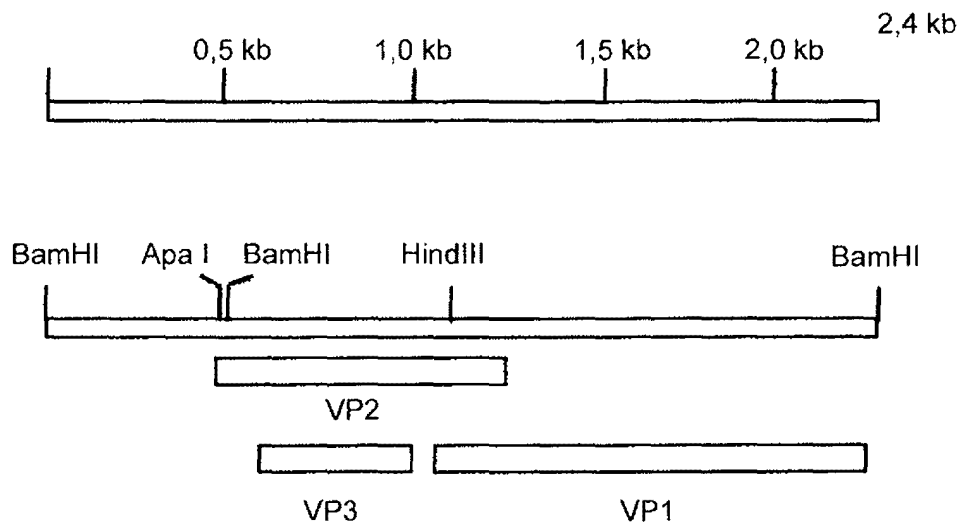


Figura 3A

```

1  M A R R R R R P R G R F Y S F R R G R W H H L K R L R R R cav vp1
1  M A R L R R R R R P R G R F G F Y H R G R W H W R H R L R R R cg2 vp1

30  - Y - - - K F R H R R R R R Y R R R A F R K A F H N P R P cav vp1
31  R Y S R R G K F R Y A R R R S F D R R V K R R I F N - P H P cg2 vp1

55  G T Y S V R L P N P Q S T M T I R F Q G V I F L T E G L I L cav vp1
60  G S Y V V R L P N P Y N K L T L F F Q G I V F I P E A Q A F cg2 vp1

85  P K N S T A G G Y A D - H M Y G A R V A K I S V N L K E F L cav vp1
90  V K S T - - - Y T K T N L T V C H V A S I N V N L R E F M cg2 vp1

114 L A S M N L T Y V S K I G G P I A G E L I A D G S K S Q A A cav vp1
116 L A T M P L D A K S K I G G P N P Y P Q H L Q G C Q W S A Q cg2 vp1

144 - - - D N W P N C W L P L D N N V P S A T P S A W W R W A L cav vp1
146 T T Q D A W P Y S A G M S E T K R P S V P P S E W W R W A L cg2 vp1

171 M M M Q P T D S C R F F N H P K Q M T L Q D M G R M F G G W cav vp1
176 L V M H P R A P G R F Y N A P K L M T L D A M G D L L G G W cg2 vp1

201 H L F R H I E T R F Q L L A T K N E G S F S P V A S L L S Q cav vp1
206 Q L F R H V R T K F R V L A T M G Q G A F S P V A S L L V Q cg2 vp1

231 G E Y L T R R D D V K Y S S D H Q N R W Q K G G Q P M - - - cav vp1
236 N D Y W S R G H L E G F P V - - - - - K G A P P M C T M cg2 vp1

258 - - - T G G I A Y A T G K M R P D E Q Q Y P A M P P D P P I cav vp1
259 Q R K I Q Q Y G N V E A N A P A D E Q W L P V N P P D P P V cg2 vp1

285 I T A T T A Q G T Q V R C - - - - - M N S T Q A W W S cav vp1
289 Y P N Q G G C S Q N V A P G I Y R L A G L Q D S S R C F Y S cg2 vp1

307 W D I Y M S F A T L T A L G A Q W S F P P G Q R S V S R R S cav vp1
319 K A C F P S F A A L S A M G A P W S F P S T Q K P I Q R G S cg2 vp1

337 F N H H K A R G A G D P K G Q R W H T L V P L G T E T I T D cav vp1
349 F N K H S I T G T G D P Q G R R W L T L V P K G V E W I T D cg2 vp1

367 S Y M S A P A S E L D T N F F T L Y V A Q G T N K S Q Q Y K cav vp1
379 D T M E Q - - T Q L D T D I A T L F L A Q G S P M W A P Y K cg2 vp1

397 F G T A T Y A L K E P V M K S D A W A V V R V Q S V W Q L G cav vp1
407 F G T F H K A M A I T A M Q T T P W C V V K V R S I W Q L G cg2 vp1

427 N R Q R P Y P W D V N W A N S T M Y W G - T Q P cav vp1
437 N Q R Q P Y P W Q V N W Y N E H T A T D R S N P cg2 vp1
    
```

Figura 3B

```

1  M H M G ----- G P A A G G S E S A L S R E G Q P P S G A A Q Q V I L M E R S F ----- R R Y S T R I N G V Q A T M K F T cav
1  M S S G L G D C S A C E T R A A G G S E L P L R E G Q L G P S G A G S T E K T L N A D P L S P T S M N Y S V R T I N G I R A S N K F V cg2

59  A V E N P S I Q R D P D W Y R C N Y H S I A V V L R E C S R S H A K I O N C G G F K H W F O E C A G L E D R S T Q A S L E E A L L P P cav
71  S H S R N D L D R D P M Y R V N Y N Y S I A T M L R C A R S H D E I C T C G R W R S H W F O E A S G L V T C E I I G T D L A R D L R R I cg2

129 R V Q G K R A K R K L D Y H Y S Q P T P M R K A Y K T V R W Q D - E L A D R E A D F T P S E E D G G T I S S D F E D ----- I N F D I cav
141 R R K G E A A K R K L D Y L R R E T P H K K T - - K T V T M Q D Y D D D L V D A L A S T I E D E T G D T C D E D A I P G G V N F D M cg2

193 G G D S G I M D E L L C R P F I - T P A P V R I V cav
209 R V E D P I T A A L R G G S S T H T R A P M W cg2
    
```

Figura 3C

```

1  MNALQEDTTPPPS-----IVFRPPTSSRPLETPHCREIRIGLAGIGITLSLCCANARAPITLRSATADNS cav
1  MQTPRSRRQA TTRSELLTAYEHPTSSCPP AETTSIEIQIGIGSTIITLS LPGYASVRVL TTRSAPADDG cgv2

66 ESTGSKNMPDLRIDQKPPSKRSCDPS EYRVSELKESLITITIPSRPPTARRCIRI cav
71 GVTGSRRLADSSHRPRRTSSPEIYVGFSAKERROKENLITLREEGPPDKLRL cgv2

```

Figura 3D

```

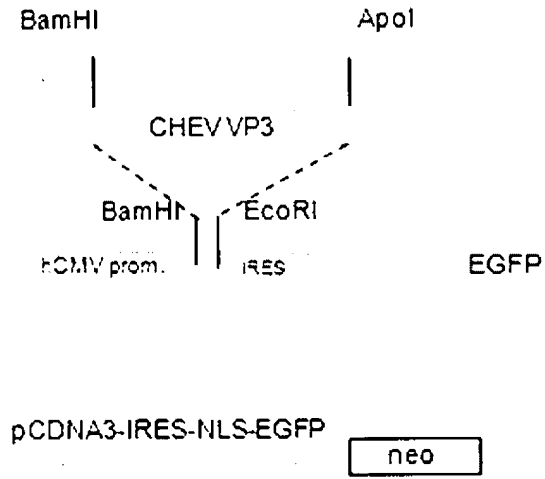
PML associação &
Região de multimerização & NES
1  MQTPRSRRQA TTRSELLTAYEHPTSSCPP AETTSIEIQI GIGSTIITLS
Região para ligar SH3
& NLS
51  LPGYASVRVL TTRSAPADDG GVTGSRRLAD SSHRPRRTS SPEIYVGFS
Região para ligar CRM1 & NLS
101  KERROKENLI TLREEGPPIK KLRL
P-Thr-111

```

Figura 4

→ Apal
 GGGGGCAGTGAATTGCCGCTTAGGCAAGAGGGGGCAACTTGGGCCCCAGCGG 550
 G A V N C R L G K R G N L G P A
 G G S E L P L R Q E G Q L G P S G
 AGCCGGATCCACGGGCAAGACACTAAATGCAGACCCCCCGCTCTCGCCGA 600
 E P D P R A R H . M Q T P R S R R
 A G S T G K T L N A D P P L S P
 CAAGCAACAACACTCTCGGTCAGACTATAAACCGCATAACGAGCATCCAAC 650
 Q A T T T R S E L . T A Y E H P T
 T S N N Y S V R T I N G I R A S N
 AAGTTCGTGTCCGCCAGCAGAAACACCTCGATAGAGATCCAAATGGTA 700
 S S C P P A E T T S I E I Q I G
 K F V S A S R N D L D R D P N W Y
 TCGGGTCAACTATAATTACTCTATCGCTACCTGGCTACGCCAGTGTGCCG 750
 I G S T I I T L S L P G Y A S V R
 R V N Y N Y S I A T W L R Q C A
 GTTCTCACGACGAGATCTGCACCTGCGGACGATGGAGGAGTCACTGGTTC 800
 V L T T R S A P A D D G G V T G S
 R S H D E I C T C G R W R S H W F
 CAGGAGGCTAGCGGACTCGTCACACAGGAGACCCAGACGGACCAGCTCGC 850
 R R L A D S S H R R P R R T S S
 Q E A S G L V T Q E T Q T D Q L A
 CAGAGATCTACGCTCGGCTTCAGCGCAAAGGAGAGGCGGCAAAAAGAAAAC 900
 P E I Y V G F S A K E R R Q K E N
 R D L R R L Q R K G E A A K R K
 TTGATTACCTTAAGAGAAGAGGGACCCCCATAAAAAAACAAGACTGTG 950
 L I T L R E E G P P I K K L R L .
 L D Y L K R R G T P H K K T K T V
 ACATGGCAAGATTACGACGACGACCTCGTGGACGCTTTGGCTTCTAC 1000
 H G K I T T T T S W T L W L L
 T W Q D Y D D D D L V D A L A S T
 CACAGAGGACGATGGCACTGGAGACACAGACTGCGACGAAGACGCTATT 1050
 P Q R T M A L E T Q T A T K T L F
 T E D D G T G D T D C D E D A I
 CCGGAGGGGTAAATTTCCGATATGCGGTAGAAGATCCTTTGATCGCCGG 1100
 P E G . I S I C A . K I L . S P R
 P G G V N F D M R V E D P L I A A
 TTNNNCTGAGATATT 1150
 ? X X X X X X X X X X X X L R Y
 ? X X X X X X X X X X X X ? E I L
 GTAGGAGATCTTCAGAAAGATGGCTCCTATGTGGTAAGGCTACCAAAC 1200
 C R R S S R K M G S Y V V R L P N
 . E I F . K D G L L C G K A T K
 HindIII
 CCTTACAATAAGCTTACCCTCTTTTCCAAGGCATTGTGTTTCATTCCGGA 1250
 P Y N K L T L F F Q G I V F I P E
 P L Q . A Y P L F P R H C V H S G

Figura 5



RESUMO

CLONAGEM DO DNA DO GYROVÍRUS DAS GALINHAS TIPO 2

DNA ou RNA recombinantes, composto pelo Gyrovírus das galinhas tipo 2 (Sigla inglês: *Chicken Gyrovirus type 2* (CGV2)-sequências de nucleotídeos específicas e sua utilização para vacinação, produção de proteínas, diagnósticos ou para terapia anti-câncer. Proteína recombinante de CGV2 e sua utilização para diagnósticos, vacinação ou produção, uso de anticorpos anti-CGV2 específicos e a utilização de proteínas recombinantes CGV2 para terapia anti-câncer.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

1) Informações Gerais do Pedido de Patente

Dados do Requerente:

- 5 Nome: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Endereço completo: Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170
Título da invenção: Clonagem do dna do gyrovírus das galinhas tipo 2
- 10 Número de seqüências constantes do pedido: 6 (seis)

2) Informações Gerais da Seqüências

Número identificador: Seq. ID nº: 01

a) tamanho: 2377 nucleotídeos

- 15 b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: genoma CGV2

Outras informações relevantes

- 20 Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica, genoma viral

- 25 GGATCCTCCCCCGGACCCCGTCAATAAATAAT'AAATAAAGCAAATTGAATTATTTATTTATTTTCGGCGCGCGG
GCAGCAGCCTGTACACAGAGACGTCGCTCGGGTCTCCGGACCCCTCGCTCCTCAACCTTTTCTTATTTAAATCATCACCC
AGCGCGACAAACGCCACAAGGCGTGGTAACCAACGATATGTAAGTAAACTGAGACTCATACCGGTACAGGGGGGTACGTC
ATCATGTACAGGGGGGTACGTCACCATGTACAGGGGGGTACGTCACCATGTACAGGGGGGTACGTCACCATGTACAGGGG
GGTACGTCACCATGTACAGGGGGGTACGTCACAGCCAATCAGAATTGAGCACGCCAGAAACGCCCTGGGCGGGCAGAT
CCTATCAATTAGGGGATATAAGCAGAGCGCATACCGGTCCGCGAGTAGGTATGTATCCGGCGGTCTCGGGGATTGCAGCG
30 CCTGTGAGACCCGAGCCGCTGGGGCAGTGAATTGCCGCTTAGGCAAGAGGGGCAACTTGGGCCAGCGGAGCCGGATCC
ACGGGCAAGACACTAAATGCAGACCCCGCTCTCGCCGACAAGCAACAATACTCGGTGAGAACTATTAACGGCATAACG
AGCATCCAACAAGTTCGTGTCGCCAGCAGAAACGACCTCGATAGAGATCCAAATTGGTATCGGGTCAACTATAATTACT
CTATCGCTACCTGGCTACGCCAGTGTGCGGTTCTCACGACGAGATCTGCACCTGCCGACGATGGAGGAGTCACTGGTTC
CAGGAGGCTAGCGACTCGTCACACAGGAGACCCAGACGGACCAGCTCGCCAGAGATCTACGTGGCTTCAGCGCAAAGG
35 AGAGCGGCAAAAAGAAAACCTTGATTACCTTAAGAGAAGAGGGACCCCCATAAAAAACTAAGACTGTGACATGGCAAG
ATTACGACGACGACACCTCGTGGACGCTTTGGCTTCTACCACAGAGGACGATGGCACTGGAGACACAGACTGCGACGAA

GACGCTATTCCCGGAGGGGTAAATTTTCGATATGCGCGTAGAAGATCCTTTGATCGCCGCGTTAAGAGGAGGATCTTCAAC
 CCACACCCGGGCTCCTATGTGGTAAGGCTACCAAACCCCTACAATAAGCTTACCCTCTTTTCCAAGGCATTTGTGTTTCAT
 TCCGGAGGCTCAAGCATTGTTAAAAGTACTTATACAAAGACTAATCTTACGGTTTGCCATGTAGCCTCAATAAATGTTA
 ACCTCCGAGAATTTATGCTTGCTACAATGCCTTTAGATGCAAAGAGCAAATCGGAGGCCCTAATCCTTATCCTCAGCAC
 5 TTGCAGGGGTGCCAATGGTCAGCACAAACGACGCAGGACGCATGGCCGTACTCGGCGGGCATGTCAGAGACAAAAGACC
 CAGCGTACCACCGAGTGAGTGGTGGCGCTGGGCTCTCCTGGTIGATGCACCCTAGAGCACCTGGCAGATTTTACAATGCC
 CTAAGCTAATGACTCTGGACGCTATGGGAGACCTCTTAGGGGGCTGGCAACTATTCCGTCATGTTAGAACCAAGTTCAGA
 GTGCTGGCCACTATGGGCCAGGGTGCATTCTCACCGGTTGCAAGCCTCCTTGTGCAAATGACTATTGGAGCAGGGGGCA
 CTTAGAGGGCTTCCCAGTGAAAGGTGCACCGCCTATGTGCACCATGCAAAGAAAGACTCAGCAATACGGCAACGTGGAGG
 10 CGAACGCTCCAGCAGATGAGCAGTGGCTACCGGTGAATCCCCAGACCCACCAGTGTACCCTAACCCAGGGAGGATGCTCC
 CAAAACGTGGCTCCAGGCATATACCGGCTGCAGGCTTACAAGACAGTAGCAGATGCTTTTATTCAAAGGCTTGTTCCTCC
 CAGCTTTGCAGCGCTTTCTGCTATGGGGCACCCCTGGTCAATTCCTAGCACTCAAAAACCCATTCAAAGAGGCTCATTTA
 ACAAACATTCATCACGGGGACAGGGGACCCCCAGGGCCGACGGTGGTTAACACTTGTGCCTAAAGGCGTGAATGGATC
 ACTGATGACACCATGGAACAAACGCAACTGGACACAGACATTCGAACACTCTTCTTAGCTCAAGGCAGCCCAATGTGGGC
 15 ACCCTACAAATTCGGGACTTTTACAAGGCAATGGCCATAACAGCAATGCAGACCACCCCTGGTGCCTGTTGAAAGTAC
 GGTCCATCTGGCAGCTCGGCAACCAAAGACAGCCGTACCCATGGCAAGTGAAGTGGTACAACGAGCATACTGCAACGGAC
 AGATCAAACCCGTAATTNN

20 Número identificador: Seq. ID n°: 02

a) tamanho: 460 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

25 b) Nome: VP1

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica, proteína do capsídeo
viral

30

MARLRRRRPRGRFGFYHRGRWHHRHLRRRRYSRRGKFRYARRRSFDRRVKRRIFNPHPGSYVVRLPNPYNKLTLLFFQGIVFI
 PEAQAFVKSTYTKTNLTVCHVASINVNLREMLATMPLDAKSKIGGNPYPQHLQGCQWSAQTTQDAWPYSAGMSETKRPSVP
 PSEWRWALLVMHPRAPGRFYNAFKLMTLDAMGDLGGWQLFRHVRTKFRVLATMGQGAFFSVASLLVQNDYWSRGHLEGFPV
 KGAPPMCTMQRKTQQYGNVEANAPADEQWLPVNPDPVPVYPNQGGCSQNVAPGIYRLAGLQDSSRCFYKACFPSSFAALSAMG
 35 APWSFPSTQKPIQRGSFNKHSITGTGDPQGRRLTLVPGKVEWITDDTMEQTQLDTDIATLFLAQGSPMWAPYKFGTFHKAMA
 ITAMQTTFCVVKVRSIWQLGNQRQPYPWQVNWYNEHTATDRSNP

Número identificador: Seq. ID n°: 03

a) tamanho: 231 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

5 a) Tipo: DNA

b) Nome: VP2

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

10 Atividade enzimática: dual specificity protein fosfatase
(dps; fosfatase de proteínas), fator de virulência viral

MSSGGLGDCSACETRAAGGSELPLRQEGQLGPSGAGSTGKTLNADPPLSPTSNNYSVRTIN
GIRASNKFVSASRNDLDRDPNWYRVNYNYSIATWLRQCARSHDEICTCGRWRSHWFQEASG
LVTQETQTDQLARDLRLQKGEAAKRKLDYLRKRRGTPHKKTKTVTWQDYDDDDLVDALAS
15 TTEDDGTGDTDCDEDAIPGGVNFDMRVEDPLIAALRGGSSSTHTRAPMW

Número identificador: Seq. ID n°: 04

a) tamanho: 124 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

20 Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: VP3

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

25 Atividade enzimática: provável indutora de apoptose,
potencial atividade anti-tumoral

MQTPRSRRQATTTTRSELLTAYEHPTSSCPPAETTSIEIQIGIGSTIITLSLPGYASVRVLT
TRSAPADDGGVGTGSRRLADSSHRRPRRTSSPEIYVGFSAKERRQKENLITLREEGPPIKLL
30 RL

Número identificador: Seq. ID n°: 05

a) tamanho: 21 nucleotídeos

b) Tipo: oligonucleotídeos

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

5 b) Nome: oligonucleotídeo para PCR NO 1

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica

10 GGTAGAAGCCAAAGCGTCCAC

Número identificador: Seq. ID n°: 06

a) tamanho: 19 nucleotídeos

15 b) Tipo: oligonucleotídeos

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: oligonucleotídeo para PCR NO 02

Outras informações relevantes

20 Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica

CGTGTCGCCAGCAGAAAC