

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

(21) PI 1103677-0 A2



* B R P I 1 1 0 3 6 7 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 27/05/2011

**(43) Data da Publicação: 02/07/2013
(RPI 2217)**

(51) Int.Cl.:

C12N 15/34

C12N 15/86

C07K 14/01

C07K 16/08

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

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

(72) Inventor(es): Ana Claudia Franco, Paulo Michel Roehe

(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.

CLONAGEM DO DNA DO GYROVÍRUS DAS GALINHAS TIPO 2

Estado da Arte

Vacinas e Diagnósticos

5 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: Set. 12 1990, NL 9002008, Set. 11 1991 PCT/ NL91 00165.

P.J. SONDERMEIJER e J.A. CLAESSENS, CHICKEN ANEMIA VIRUS
10 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 MUTANTS AND VACCINES BASED ON THE VIRAL PROTEIN VP3 OR SEQUENCES OF THAT VIRUS CODING THEREFORE. Patente Aplicação:
15 PT1253201 (E), Publicação data: 2008-10-27. [Também como WO9503414 (A2)]

Terapia anti-câncer.

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

Campo de Tecnologia

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

30 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
5 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
10 orientação negativa tais como o *torque teno virus* (TTV) de humanos e suínos e *torque teno-like mini-virus* (TMMV), tem sido classificados como um gênero flutuante da mesma família, chamado de *Anellovirus*. Estes anelovírus compartilham homologia de seqüências com outros membros da família
15 *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.
20 (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
25 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* (TMMV e TTV) estas ORFs estão na mesma fita e é a fita anti-sense que é encapsidada nos
30 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*Proteínas do CAV*

Até o momento, com base em resultados de seqüenciamento genômico e expressão de ORFs de CAV, foram identificadas três
5 proteínas codificadas por este vírus: VP1, VP2 e VP3 [SCHAT, K. A. Chicken Infectious Anemia. IN: SAIF, Y.M., et al. (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
10 do CAV está localizada dentro da ORF2 e esta se sobrepõe à ORF1. A VP1 do CAV é o principal componente do capsídeo e 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
15 properties of chicken anaemia virus proteins 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
20 the CAV-specific neutralizing epitope. J Gen Virol. 1998 Dec;79 (Pt 12):3073-7.]

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,
25 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, Verschueren CA, Koch G, Van der Eb AJ., Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded
30 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].

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 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 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
Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumniyom N,
Wajjawalku W, Meng XJ.,

Epitope mapping of the major capsid protein of type 2
5 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. J
Virol. 2004 Aug;78(15):8135-45.] A proteína codificada pela
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
10 ativação da rota iniciador caspase-8 e efetor caspase-3 [Liu
J, Chen I, Kwang J., Characterization of a previously
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.]

15 *Proteínas dos TTVs*

Em comparação com as proteínas de CAV e PCV, muito menos
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
20 proteínas possuem uma região amino terminal hidrofílica com
afinidade de ligação por DNA [Okamoto H, Mayumi M., TT virus:
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
25 podem apresentar alta diversidade genética, mesmo entre
isolados do mesmo genótipo e encontrados no mesmo indivíduo
[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
30 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 sobre a variabilidade antigênica ou patogênica destas variações não são conhecidas.

Embora haja similaridades entre as proteínas de TTVs e
5 as proteínas de CAV, as funções das proteínas codificadas pelas ORF 2 e 3 dos TTVs ainda têm que ser elucidadas [Hino 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
10 TTVs clonada e expressa em linhagem celular de hepatocarcinoma é capaz de induzir apoptose [Kooistra K, 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
15 Gen Virol. 2004 Jun;85(Pt 6):1445-50].

Os circovírus são difíceis de se multiplicarem em 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
20 individuais, títulos mais altos podem ser obtidos. [Yuasa, 1983 N. Yuasa, Propagation and infectivity titration of the 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].

25 O CGV2 é um vírus recém descoberto e pertence à família Circoviridae e está implicado em hemorragias no cérebro de galinhas infectadas [Roehe 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
30 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 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
5 contains all elements for the infectious replication cycle, J. Virol. 65 (1991) 3131-3139.]. A similaridade global entre 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
10 aconteceu com outros circovírus, o vírus pode espalhar-se sobre todos os países de principais produtores de frangos [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
15 CAV, o qual já foi detectado em outras espécies de aves [T. Farkas ; K. Maeda ; H. Sugiura; K. Kai ; K. Hirai ; K. Otsuki ;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
20 - 320], é possível que o CGV2 seja também capaz de infectar outras espécies como codornas, faisões ou perus.

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.

25 Vacinas

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
30 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

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
5 vacinas vivas atenuadas também podem ser constituídas de 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
10 vírus. Uma outra forma de produzir uma vacina recombinante é 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
15 vírus vivo que é capaz de infectar e se multiplicar no hospedeiro, o que aumenta a intensidade e a duração da 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
20 mais curta do que as vacinas vivas, devido à sua incapacidade 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
25 que expressam regiões do genoma de CGV2 que codificam 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
30 codificando antígenos do CGV2 que estimulam uma resposta imune contra CGV2.

Apoptose

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
5 um fator essencial no desenvolvimento da doença clínica é a 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,
10 pois induz apoptose celular em células tumorais ou 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
15 acumula no citoplasma celular, ao contrário das células 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
20 tumores.

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
25 com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode 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
30 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

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 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. Noteborn, D. Todd, C.A. Verschueren, H.W. de Gouw, 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 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-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 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, 5 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 10 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 15 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 20 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, 25 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 30 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
5 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
10 (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
15 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
20 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-
25 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
30 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. Notelborn, Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27729-27736]. A localização desta proteína é
5 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
10 VP3/Apoptin, *J. Virol.* 79 (2005) 1339-1341; J.L. Rohn, M.H. Notelborn, 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
15 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
20 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
25 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
30 inoculação de vetores virais expressando VP3 (adenovírus, poxvírus), superexpressão transitória ou por conjugação da VP3 com proteínas reconhecidas por receptores celulares 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. 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. 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 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.

20 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].

25 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
30 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
5 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
10 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
15 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
20 inventores do presente pedido de patente usam a amplificação com Phi29 DNA polimerase e métodos de transfecção para isolar o vírus CGV2.

Os presentes inventores caracterizaram a forma de fita dupla do genoma inteiro do CGV2. Este genoma tem um
25 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 saudáveis e doentes.

30 A análise de produtos de amplificação da Phi29 DNA polimerase de quatro amostras diferentes isoladas de campo 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 (SEQ ID NO: 1) o DNA do CGV2 foi amplificado especificamente.

Amostras coletadas de galinhas (108 amostras do Rio Grande do Sul, 48 amostras de Santa Catarina e 21 amostras coletadas na Holanda) foram analisadas para a presença de DNA de AGV2 através da PCR. DNA de AGV2 foi encontrado em 98/108 (90,7%) e 29/48 (60,4%) amostras testadas. Das 21 amostras da Holanda, 9 (42,9%) foram positivas. A análise da sequencia de nucleotídeos de 27 amostras amplificadas demonstrou a presença de variantes genômicos e antigênicos de AGV2.

Descrição Breve das Figuras

FIG. 1 mostra os produtos de amplificação da Phi29 DNA polimerase de quatro soros diferentes de galinhas doentes 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 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. 3A mostra a comparação das seqüências da VP1 do CAV (Noteborn, M.H.M., de Boer, G.F., van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H.M., Hoeben, R.C., Zantema, A., Koch, G., van Ormondt, H. and van

der Eb, A.J. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology* 65 (6), 3131-3139 (1991), Número de acesso NCBI Q99153, e CGV2 utilizando o programa MegAlign ClustalV program sob condições PAM 250: 38,8% de identidade de aminoácidos.

FIG 3B mostra a comparação das sequências da VP2 do CAV (Meehan, B.M., Todd, D., Creelan, J.L., Earle, J.A.P., Hoey, E.M. and McNulty, M.S. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent. Sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments *Archives of Virology* 124(3/4), 301-319 (1992), Número de acesso NCBI AAC58476) e do CGV2, utilizando o programa MegAlign ClustalV sob condições PAM 250: 40,7% de identidade de aminoácidos.

FIG 3C mostra a comparação das sequências da VP3 do CAV (Meehan, B.M., Todd, D., Creelan, J.L., Earle, J.A.P., Hoey, E.M. and McNulty, M.S. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent. Sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments *Archives of Virology* 124(3/4), 301-319 (1992), Número de acesso NCBI 2003171B) e do CGV2, utilizando o programa MegAlign ClustalV sob condições PAM 250: 31,4% de identidade de aminoácidos.

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

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

FIG. 6 mostra a origem e sinais clínicos relacionados às amostras de galinhas usadas no sequenciamento.

FIG. 7 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína VP3 das diferentes amostras sequenciadas.

FIG. 8 mostra a árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos da VP3

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção fornece informação específica sobre a sequência de nucleotídeos correspondentes à, ou complementares, à sequência de nucleotídeos de um genoma de CGV2. A modalidade preferida da presente invenção consiste na tal sequência de nucleotídeos de CGV2 especificamente correspondente à, ou complementar, à sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 1, uma mesma sequência de nucleotídeos semelhantes a pelo menos 70%, ou parte dele. A 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.

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 sequências de CGV2 são suficientes para a aplicação necessária.

Uma primeira possibilidade preferida é uma sequência de nucleotídeos específicos do CGV2 correspondendo a, ou complementar, a uma sequência 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 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.

Em um segundo aspecto, a invenção compreende o uso da
5 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 exemplo, da utilização da informação genética de recombinação
10 de acordo com a invenção como uma sonda CGV2-específica ou *oligonucleotídeo* em um processo para detectar ácidos nucleicos 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
15 informações genéticas recombinantes de acordo com a invenção, 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
20 do tipo selvagem CGV2 ou em um recombinante CGV2 mutante, e 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
25 informação genética recombinante de acordo com a invenção e, 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
30 genética de acordo com a invenção, compreendendo uma 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 nucleotídeos que codifica proteínas de CGV2 ou partes dele e
5 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 invenção para a terapia anti-tumoral ou para fins de
10 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
15 reagente para ligar anticorpos CGV2 - específicos em um processo de imunoensaio 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 imunoensaio,
20 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
25 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
30 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
5 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
10 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
15 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
20 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

25 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
30 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 por 30 min a 37°C.

Isolamento de DNA de tecidos de frango

5 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 al. 1993. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type
10 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
15 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 ressuspenso em 100 µl de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4).

20 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
25 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
30 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 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 [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 seqüência 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 seqüência 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 [Lipofectamine™ 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

5 Sequenciamento e análise comparativa das sequências de nucleotídeos.

A determinação das sequências de produtos de PCR é realizada em um sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer utilizando-se o Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
10 (Applied biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Cada produto de PCR é sequenciado quatro vezes. As sequências obtidas foram comparadas utilizando-se o programa BioEdit package 7.0.5 (Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
15 analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41. Vector NTI 8.0, AlignX e ContigExpress (InforMax, Inc.). As sequências foram comparadas e alinhadas com a região correspondente do AGV2 utilizando o programa Clustal W (Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). Clustal
20 W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nuc. Acid. Res. 22, 4673-4680). A análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA-3 (Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004).
25 Mega3: integrated software for molecular evolutionary

genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5, 150-163).

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 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, 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 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 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
5 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
uma necrópsia é realizada de 3 + 3 frangos por grupo. O peso
corporal é medido e fluidos corporais (sangue com heparina,
10 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
15 coloração por imunoperoxidase com soros de frango positivos
para CGV2. O mesmo procedimento é repetido em 12 e 18 dias
após a infecção.

Exemplos

20 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
25 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
30 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 quatro amostras diferentes de galinhas doentes foram comparados e os quatro apresentaram o mesmo padrão de fragmentos BamHI. (Figura 1) A identidade desses fragmentos
5 foi confirmada pela análise da seqüência (dados não mostrados).

Exemplo 2

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

10 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
15 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
20 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
25 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.
30 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).

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 (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 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 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 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

10 Exemplo 5

Aplicação da PCR a amostras de galinhas saudáveis e doentes do Rio Grande do Sul, Santa Catarina (Brasil) e Holanda

De 109 amostras de galinhas do Rio Grande do Sul (104 de animais saudáveis e cinco de animais doentes), 99 (90,7%) foram positivas na reação de PCR. Das 48 amostras de galinhas saudáveis de Santa Catarina, 29 (60,4%) foram positivas na PCR. Estes dados atestam a ampla distribuição do AGV2 em galinhas na região Sul do Brasil. Das 21 amostras de cérebro de galinhas da Holanda, 9 (42,9%) foram positivas para AGV2, mostrando que o vírus está presente também em galinhas na Europa.

Exemplo 6

25 Comparação da sequência de nucleotídeos dos produtos de amplificação obtidos

As sequências de nucleotídeos de vinte e sete amplicons de AGV2, incluindo 14 amostras do Rio Grande do Sul, 8 de

Santa Catarina e cinco da Holanda foram determinadas. A comparação das sequências obtidas revelou que, de 22 sequências obtidas da região Sul do Brasil, 18 foram idênticas entre si e em relação à sequência ID n°: 01. Todas
5 essas 18 amostras foram obtidas de galinhas saudáveis. Outras 3 sequências obtidas de animais doentes (com perda de peso e queda na produção de ovos) foram idênticas entre si e diferiram em 11,5 % com relação às amostras de galinhas saudáveis. Estas diferenças de nucleotídeos levaram à
10 alterações em 5 e 8 aminoácidos nas proteínas VP2 e VP3, respectivamente, em relação às amostras de galinhas saudáveis. Por outro lado, uma amostra brasileira, obtida de galinha que apresentou lesões cerebrais, apresentou variação de 13,1% na sequência de nucleotídeos com relação às amostras
15 de galinhas saudáveis e foi idêntica a 3 sequências obtidas de galinhas com lesões cerebrais da Holanda. Uma das amostras da Holanda apresentou 8,7% de diferenças de nucleotídeos em relação à sequência ID n°: 01 e 11,6% de variação em relação às outras sequências da Holanda.

20 Utilizando todas as 27 sequências dos produtos de PCR e a sequência correspondente à sequência ID n°: 01, foi construída uma árvore filogenética. Esta apresentou 3 clusters, um formado pela maioria das amostras brasileiras (obtidas de galinhas saudáveis), um grupo composto de

sequências da Holanda e a amostra SM_BRA e um terceiro cluster formado por amostras brasileiras de galinhas doentes.

Exemplo 7

Construção de um mutante de CGV2 VP3 negativo

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 8

Expressão da VP3 de CGV2 em eucariotos

5 Todas as proteínas CGV2 podem ser produzidas usando sistemas de expressão de procariotos ou eucariotos. O conhecimento sobre as regiões codificantes do CGV2 é suficiente para utilizar tais regiões para clonagem em um vetor de expressão adequado. Existem vários sistemas de

10 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 célula hospedeira, vetores virais, tais como vetores retrovirais, adenovírus, baculovírus pseudo-tipo podem ser

15 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 replicação de mutantes de CGV2 VP3 mutantes negativos. A região codificante da VP3 do CGV2 é isolada de um sub-clone

20 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 e utilizado em uma reação de ligação com o plasmídeo pcDNA3+ IRES-GFP-NLS digerido com BamHI e EcoRI. Um plasmídeo

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

30 VP3 do CGV2 expressa.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

1) Informações Gerais do Pedido de Patente

Dados do Requerente:

Nome: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço completo: Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre,
RS, Brasil, CEP 90050-170Título da invenção: Clonagem do dna do gyrovírus das
galinhas tipo 2

Número de seqüências constantes do pedido: 6 (seis)

2) Informações Gerais das Seqüências

Número identificador: Seq. ID nº: 01

a) tamanho: 2383 nucleotídeos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: genoma CGV2

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica, genoma viral

```

1 GGATCCTCCC CCCCGGACCC CCCGTCAATA AATAATTAAA TAAAGCAAAT TGAATTATTT
61 ATTTATTTTC GCGCGCGCG GCAGCAGCCT GTACACAGAG ACGTCGCTCG GGTCCTCCGG
121 ACCCTCGCTC CTCAACCTTT TCTTATTTAAA ATCATCACCC AGCGCGACAA ACGCCACAAG
181 GCGTGGTAAC CAACGATATG TAAGTAAACT GAGACTCATA CCGGTACAGG GGGGTACGTC
241 ATCATGTACA GGGGGGTACG TCACCATGTA CAGGGGGGTA CGTCACCATG TACAGGGGGG
301 TACGTACCA TGTACAGGGG GGTACGTCAC CATGTACAGG GGGGTACGTC ACAGCCAATC
361 AGAATTGAGC ACGCCCAGAA ACGCCCCTGG GCGGGCAGAT CCTATCAATT AGGGGATATA
421 AGCAGAGCGC ATACCGGTCG GCAGTAGGTA TGTCATCCGG CGGTCTCGGG GATTGCAGCG
481 CCTGTGAGAC CCGAGCCGCT GGGGGCAGTG AATTGCCGCT TAGGCAAGAG GGGCAACTTG
541 GGCCAGCGG AGCCGGATCC ACGGGCAAGA CACTAAATGC AGACCCCCG CTCTCGCCGA
601 CAAGCAACAA CTACTCGGTC AGAACTATTA ACGGCATACG AGCATCCAAC AAGTTCGTGT
661 CCGCCAGCAG AAACGACCTC GATAGAGATC CAAATTGGTA TCGGGTCAAC TATAATTACT
721 CTATCGCTAC CTGGCTACGC CAGTGTGCGC GTTCTCACGA CGAGATCTGC ACCTGCGGAC
781 GATGGAGGAG TCACTGGTTC CAGGAGGCTA GCGGACTCGT CACACAGGAG ACCCAGACGG
841 ACCAGCTCGC CAGAGATCTA CGTCGGCTTC AGCGCAAAGG AGAGGCGGCA AAAAGAAAAC
901 TTGATTACCT TAAGAGAAGA GGGACCCCCC ATAAAAAAC TAAGACTGTG ACATGGCAAG
961 ATTACGACGA CGACGACCTC GTGGACGCTT TGGCTTCTAC CACAGAGGAC GATGGCACTG
1021 GAGACACAGA CTGCGACGAA GACGCTATTC CCGGAGGGGT AAATTTTCGAT ATGCGCGTAG
1081 AAGATCCTTT GATCGCCGCG TTAAGAGGAG GATCTTCAAC CCACACCCGG GTCCTATGT

```

1141 GGTAAGGCTA CCAAACCCTT ACAATAAGCT TACCCTCTTT TTCCAAGGCA TTGTGTTTCA
 1201 TCCGGAGGCT CAAGCATTTG TAAAAAGTAC TTATACAAAG ACTAATCTTA CGGTTTGCCA
 1261 TGTAGCCTCA ATAAATGTTA ACCTCCGAGA ATTTATGCTT GCTACAATGC CTTTAGATGC
 1321 AAAGAGCAAA ATCGGAGGCC CTAATCCTTA TCCTCAGCAC TTGCAGGGGT GCCAATGGTC
 1381 AGCACAAACG ACGCAGGACG CATGGCCGTA CTCGGCGGGC ATGTCAGAGA CAAAAAGACC
 1441 CAGCGTACCA CCGAGTGAGT GGTGGCGCTG GGCTCTCCTG GTGATGCACC CTAGAGCACC
 1501 TGGCAGATTT TACAATGCC CTAAGCTAAT GACTCTGGAC GCTATGGGAG ACCTCTTAGG
 1561 GGGCTGGCAA CTATTCCGTC ATGTTAGAAC CAAGTTCAGA GTGCTGGCCA CTATGGGCCA
 1621 GGGTGCATTC TCACCGGTTG CAAGCCTCCT TGTGCAAAAT GACTATTGGA GCAGGGGGCA
 1681 CTTAGAGGGC TTCCCAGTGA AAGGTGCACC GCCTATGTGC ACCATGCAAA GAAAGACTCA
 1741 GCAATACGGC AACGTGGAGG CGAACGCTCC AGCAGATGAG CAGTGGCTAC CGGTGAATCC
 1801 CCCAGACCCA CCAGTGTACC CTAACCAGGG AGGATGCTCC CAAAACGTGG CTCCAGGCAT
 1861 ATACCGGCTT GCAGGCTTAC AAGACAGTAG CAGATGCTTT TATTCAAAGG CTTGTTTCCC
 1921 CAGCTTTGCA GCGCTTCTG CTATGGGGGC ACCCTGGTCA TTTCTAGCA CTCAAAAACC
 1981 CATTCAAAGA GGCTCATTTA ACAAACATTC CATCACGGGG ACAGGGGACC CCCAGGGCCG
 2041 ACGGTGGTTA ACACTTGTGC CTAAAGGCGT GGAATGGATC ACTGATGACA CCATGGAACA
 2101 AACGCAACTG GACACAGACA TTGCAACACT CTTCTTAGCT CAAGGCAGCC CAATGTGGGC
 2161 ACCCTACAAA TTCGGGACTT TTCACAAGGC AATGGCCATA ACAGCAATGC AGACCACCCC
 2221 CTGGTGCCTG GTGAAAGTAC GGTCCATCTG GCAGCTCGGC AACCAAAGAC AGCCGTACCC
 2281 ATGGCAAGTG AACTGGTACA ACGAGCATAC TGCAACGGAC AGATACAACC CGTAATTGGG

 2341 gggggggggtt ttgccccccc cacaaacccc ccccccccg ggg

Número identificador: Seq. ID nº: 02

a) tamanho: 460 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: VP1

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica, proteína do capsídeo viral

MARLRRRRPRGRFGFYHRGRWHRHRLRRRRYSRRGKFRYARRRSFDRRVKRI FNPHPGSYVVRLPNPYNKLTLLFFQGIV
 FIPEAQAFVKSTYTKNLTVCHVAS INVNLREFMLATMPLDAKSKIGGPNYPYQHLQGCQWSAQTQTQDAWPYSAGMSETKR
 PSVPPSEWRRWALLVMHPRAPGRFYNA PKLMTLDAMGDLGGWQLFRHVRTKFRVLATMGQGA FSPVASLLVQNDYWSRGH
 LEGFPVKGAPPMCTMQRK TQQYGNVEANAPADEQWLPVNPDPDPVYPNQGGCSQNVAPGIYRLAGLQDSSRCFYSKACFPS
 FAALSAMGAPWSPSTQKPIQRGSFNKHSITGTGDPQGRRWLTLV PKGVEWITDDTMEQTQLD TDIATLFLAQGSPMWAPY
 KFGTFHKAMAITAMQTTPWCVVKVR SIWQLGNQRQPYPWQVNWYNEHTATDRSNP

Número identificador: Seq. ID n°: 03

a) tamanho: 231 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: VP2

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

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

```
MSSGGLGDCSACETRAAGGSELPLRQEGQLGPSGAGSTGKTLNADPPLSPTSNNYSVRT  
INGIRASNKFVSASRNDLDRDPNWRVNYNYSIATWLRQCARSHDEICTCGRWRSHWFQ  
EASGLVTQETQTDQLARDLRRLLQRKGEAAKRKLDYLRKRRGTPHKKTKTVTWQDYDDDDL  
VDALASTTEDDGTGDTDCEDAI PGGVNFDMRVEDPLIAALRGGSSSTHTRAPMW
```

Número identificador: Seq. ID n°: 04

a) tamanho: 124 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: DNA

b) Nome: VP3

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

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

```
MQTPRSRRQATTTRESELLTAYEHPTSSCPPAETTSIEIQIGIGSTIITLSLPGYASVRV  
LTTTSAPADDGGVTGSRRLADSSHRRPRRTSSPEIYVGFSKERRQKENLITLREEGPP  
IKKLRL
```

Número identificador: Seq. ID n°: 05

a) tamanho: 21 nucleotídeos

b) Tipo: oligonucleotídeos

Características da molécula seqüenciada:

- a) Tipo: DNA
- b) Nome: oligonucleotídeo para PCR NO 1

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica

GGTAGAAGCCAAAGCGTCCAC

Número identificador: Seq. ID n°: 06

- a) tamanho: 19 nucleotídeos
- b) Tipo: oligonucleotídeos

Características da molécula seqüenciada:

- a) Tipo: DNA
- b) Nome: oligonucleotídeo para PCR NO 02

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: soro de galinha

Atividade enzimática: não se aplica

CGTGTCCGCCAGCAGAAAC

REIVINDICAÇÕES

1. A clonagem do DNA do Gyrovírus das galinhas tipo 2, caracterizado por compreender seqüências de nucleotídeos que
5 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:

10 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 %

15 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
20 compreender pelo menos parte do genoma do CGV2.

4. Uma seqüência de nucleotídeos de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato desta seqüência conter pelo menos parte da seqüência de nucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1 ou uma seqüência similar de aminoácidos com
25 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
30 recombinante de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela seqüência de nucleotídeos ser funcionalmente ligada a uma seqüência de controle de expressão.

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

8. Uma célula hospedeira transformada com uma sequência de nucleotídeos de acordo com as reivindicações 1-4
5 caracterizado por conter um vetor viral de acordo com a reivindicação 7

9. Uma molécula de nucleotídeos recombinante de acordo com as reivindicações 5-6 caracterizado por conter um vetor viral de acordo com a reivindicação 7.

10 10. Um polipeptídeo caracterizado por conter características imunogênicas de um antígeno relacionado ao CGV2.

11. Um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por conter pelo menos parte da sequência de
15 aminoácidos:

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

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

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

12. Um polipeptídeo relacionado a CGV2 e codificado por uma sequência de nucleotídeos de acordo com as reivindicações 1-4 caracterizado por conter identidade de nucleotídeos maior do que 70 %.

30 13. Um anticorpo ou anti-soro caracterizado por ser imunorreativo a um polipeptídeo de acordo com as reivindicações 9-11.

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

15 15. 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
10 acordo com a reivindicação 6, uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 8, um polipeptídeo de acordo com as reivindicações 10 -12 ou um CGV2 de acordo com a reivindicação 11.

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

20 17. Um método para a preparação de uma vacina contra CGV2, caracterizado por conter um polipeptídeo (mínimo 12 aminoácidos) de acordo com as reivindicações 10-12 que é processado em uma preparação farmacêutica com atividade imunizante.

25 18. Um método para a proteção das galinhas contra infecção por CGV2 caracterizado por uma quantidade eficaz de uma vacina de acordo com a reivindicação 15 ser administrada aos animais.

30 19. Um reagente imunoquímico caracterizado por compreender um polipeptídeo (mínimo 12 aminoácidos) de acordo com as reivindicações 10-12.

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

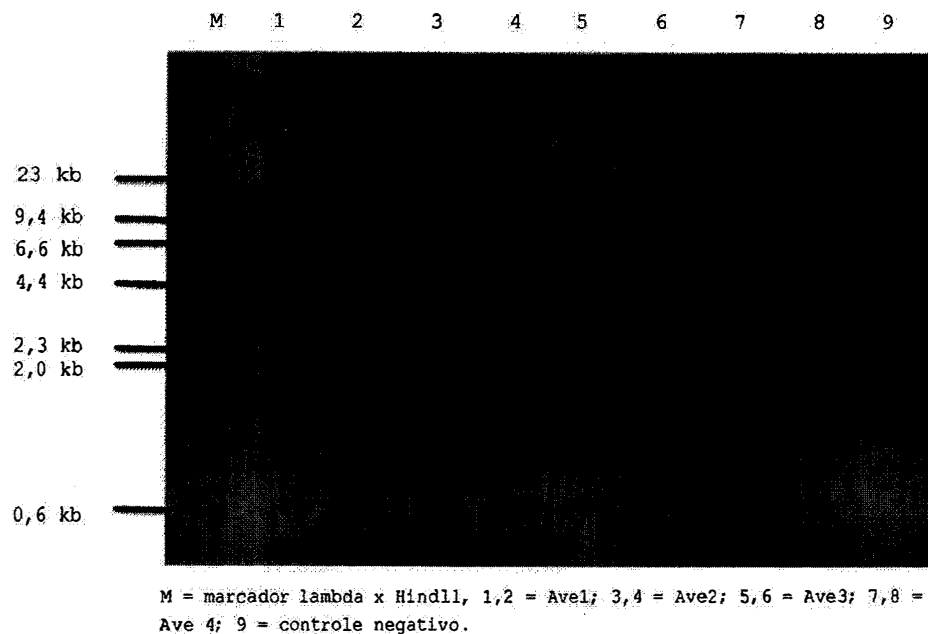
21. Uma molécula de nucleotídeos recombinante
5 caracterizada por compreender uma seqüência de ácido nucléico para expressar pelo menos parte (mínimo 12 aminoácidos) da seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4 ou equivalentes funcionais utilizados para terapia anti-câncer.

22. Uma proteína caracterizada por compreender pelo
10 menos 12 aminoácidos da seqüência SEQ ID NO: 4 expressa separadamente utilizada para terapia anti-câncer.

23. Uma proteína caracterizada por compreender pelo
menos 12 aminoácidos da seqüência SEQ ID NO: 4 expressa como
parte de uma proteína de fusão ou equivalentes funcionais
15 utilizados para terapia anti-câncer.

FIGURAS

Figura 1



5

Figura 2

Genoma de CGV2

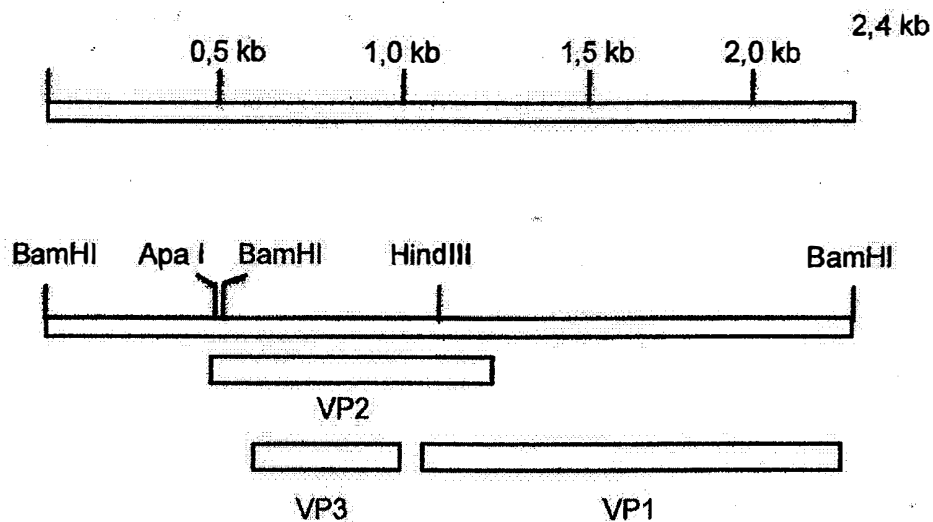


Figura 3 A

Comparação da VP1 de CGV2 e CAV

5

10

```

1   M A R R - R A R R P R G R F Y S F R 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 Q 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 T 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 T 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 T 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

```

15 Figura 3B

Comparação da VP2 do CGV2 e CAV

```

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

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

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

193 G C D S G - M D E L L G R P F I I - P 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 R A P M W   cg2

```

Figura 3C

5 Comparação da VP3 do CGV2 e CAV

```

1  MDALQEDTPPGPE-----IVKRPPTSSRPEPHCRETRIGTAGIGITLSICGCAMARAPIRSATAINS cav
1  MQTPRSRRQATTTRSELLTAYEHPTSSCPPAETTSIEIQIGGIGSTIITLSIPGYASVRVLTTRSAPADDG cgv2

65 ESTCSFNVPDLRLDQPPSPSPSCDPSEYSRLKESLITITIPSRPPARRCIRI cav
71 GVTCSRRLADSSHRRPRTSSPEIYVGFSAKRRPQEMLITLDEEGPKELKLI cgv2

```

10

Figura 3D

Regiões funcionais presumíveis da proteína VP3 de CGV2

```

PML associação &
Região de multimerização & NES
1  MQTPRSRRQA TTTRSELLTA YEHPTSSCPP AETTSIEIQI GIGSTIITLS
Região para ligar SH3
& NLS
51 IPGYASVRVL TTRSAPADDG GVTGSRRLAD SSHRPPRRTS SPEIYVGFSA
Região para ligar CRM1 & NLS
101 KERROKENLI TLREEGPPIK KLRL
P-Thr-111

```

15

Figura 4

GGGGGCAGTGAATTGCCGCTTAGGCAAGAGGGGCAACTTGGGCCACGCGG 55C
 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
 AGCCGGATCCACGGGAAGACACTAAATGCAGACCCCCCGCTCTCGCCGA 60C
 E P D P R A R H . M Q T P R S R R
 A G S T G K T I N A D P P L S P
 CAAGCAACAACACTACTCGGTGAGACTATAAACGCATACGAGCATCCAAC 65C
 Q A T T T R S 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
 AAGTTCGTGTCCGCCAGCAGAAACACCTCGATAGAGATCCAAATTGGTA 70C
 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
 TCGGTCAACTATAATTACTCTATCGCTACCTGGCTACGCCAGTGTGCCG 75C
 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 80C
 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 85C
 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
 CAGAGATCTACGTGGCTTCAGCGCAAAGGAGAGCGCGCAAAAAGAAAAC 90C
 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
 TTGATTACTTAAAGAGAAGAGGGACCCCCATAAAAAAACTAAGACTGTG 95C
 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
 ACATGGCAAGATTACGACGACGACACCTCGTGGACGCTTTGGCTTCTAC 10C
 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
 CACAGAGGACGATGGCACTGGAGACACAGACTGCGAGAGAAGACGCTATTC 105C
 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
 CCGGAGGGGTAAATTTTCGATATGCGCGTAGAAGATCCTTTGATCGCCGCG 110C
 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
 TTNNCTGAGATAT 115C
 ? X 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 X ? E I L
 GTAGGAGATCTTCTAGAAAAGATGGGCTCCTATGTGGTAAGGCTACCAAAC 120C
 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
 CCTTACAATAAGCTTACCCTCTTTTCCAAGGCATTGTGTTTCATTCCGGA 125C
 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

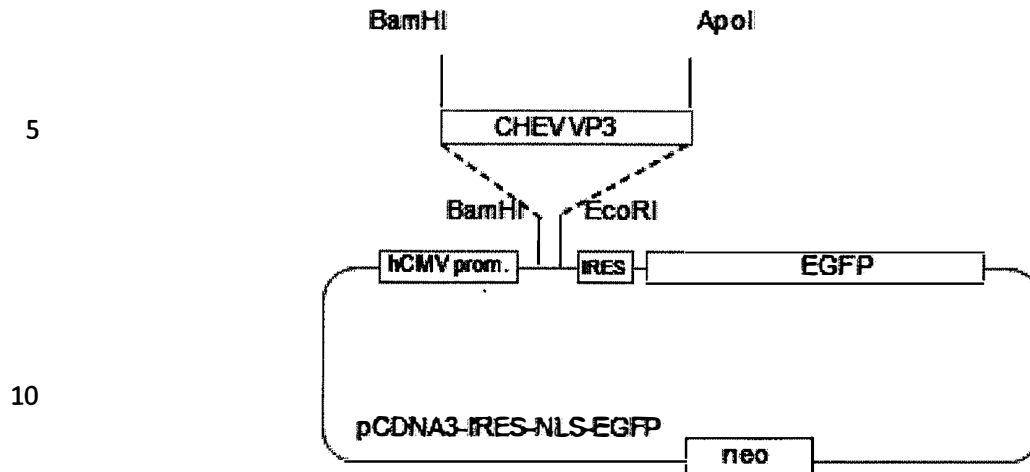


Figura 6

Amostra	Sinais clínicos/lesões	Origem ¹⁵
3 HOL	Lesões cerebrais	Holanda
8 HOL		
14 HOL		
15 HOL		
20 HOL		
SM BRA	Ausentes	20
5SC BRA		
8SC BRA		
12SC BRA		
14SC BRA		
15SC BRA		
20SC BRA		
22SC BRA		
1RS BRA		
2RS BRA		
3RS BRA		
4RS BRA		
A6RS BRA		
A12RS BRA		
B4RS BRA		
B5RS BRA		
B7RS BRA		
B8RS BRA		
4SC BRA	Perda de peso	25
068 11		
AGV2 N1		
AGV2 N5		30

Figura 7

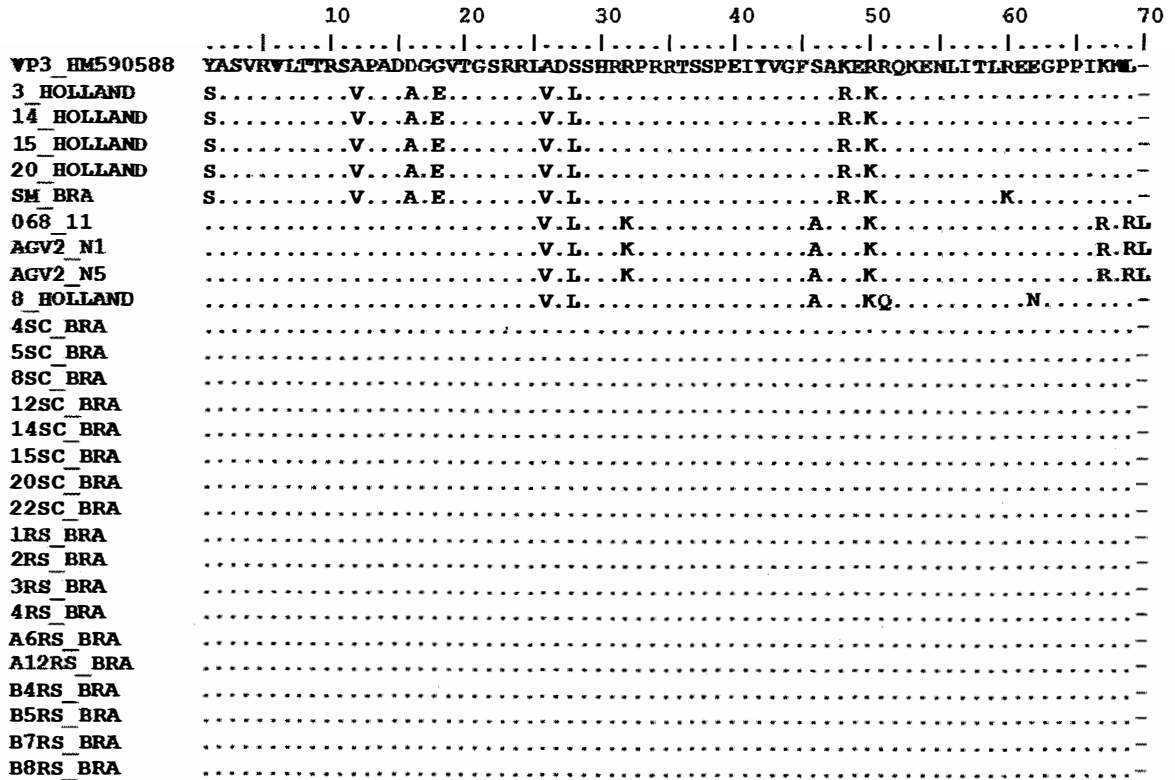
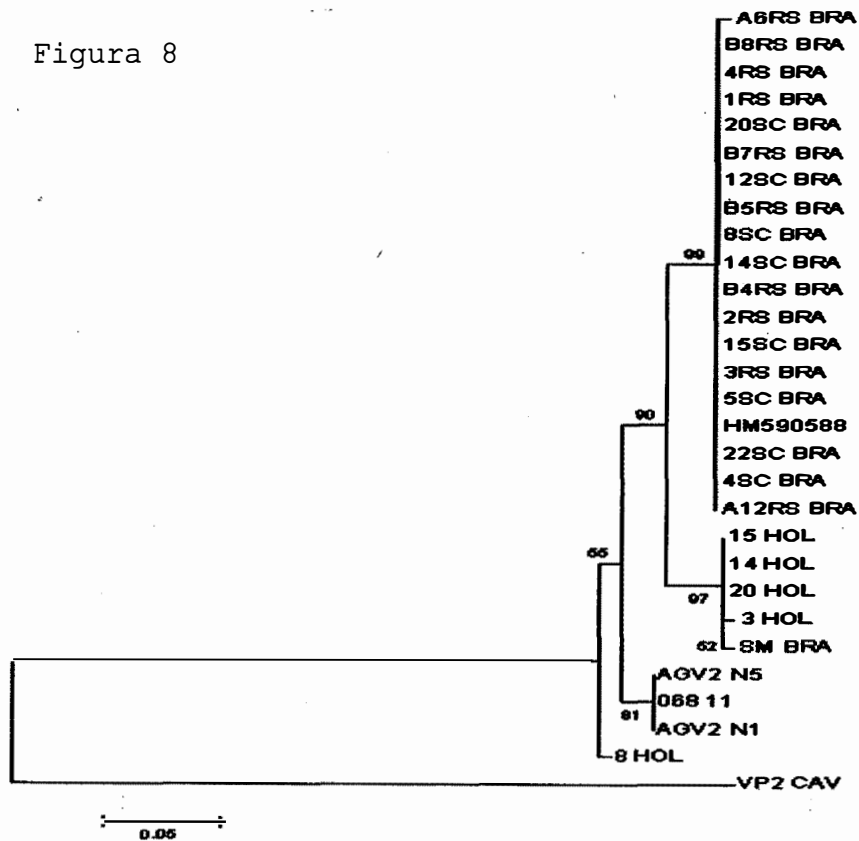


Figura 8

5



RESUMO**CLONAGEM DO DNA DO GYROVÍRUS DAS GALINHAS TIPO 2**

DNA ou RNA recombinantes, composto pelo Gyrovírus das
5 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,
10 vacinação ou produção, uso de anticorpos anti-CGV2
específicos e a utilização de proteínas recombinantes CGV2
para terapia anti-câncer.