

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 307**

51 Int. Cl.:

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2004** **E 04714865 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **30.11.2005** **EP 1599495**

54 Título: **Proteínas y genes del virus del Nilo occidental y del dengue y su aplicación terapéutica**

30 Prioridad:

26.02.2003 CA 2420092

20.06.2003 CA 2432738

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.01.2013

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (50.0%)
25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX
75724 PARIS CEDEX 15, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)

72 Inventor/es:

TANGY, FRÉDÉRIC;
DESPRES, PHILIPPE;
COMBREDT, CHANTAL y
FRENKIEL, MARIE PASCALE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 394 307 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas y genes del virus del Nilo occidental y del dengue y su aplicación terapéutica.

5 **Campo de la invención**

La solicitud describe el virus del Nilo occidental (VNO) y/o péptidos procedentes del virus del dengue, y más especialmente polipéptidos o polinucleótidos procedentes de VNO y/o polipéptidos o polinucleótidos del virus del dengue y su utilización en la preparación de composiciones y vacunas. La presente invención se refiere a composiciones, vacunas y procedimientos para proporcionar una respuesta inmunitaria y/o una inmunidad protectora frente a los animales contra un virus del Nilo occidental o un virus del dengue.

Antecedentes de la invención

Flaviviridae son arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) transportados principalmente por mosquitos y garrapatas que chupan sangre. Son pequeños virus encapsulados y sus genomas están constituidos por ARN monocatenario y lineal infeccioso de polaridad positiva. En el hombre, los flavivirus ocasionan fiebre hemorrágica mortal o meningoencefalitis. La fiebre amarilla, la fiebre del dengue y la encefalitis japonesa son los principales flavivirus tropicales. Otras importantes flavivirus humanas son la encefalitis de Saint Louis, la encefalitis europea transmitida por garrapatas y la fiebre del Nilo occidental.

La fiebre del Nilo occidental es una zoonosis asociada a un flavivirus que fue aislada por primera vez en Uganda en 1937. Su ciclo de transmisión requiere aves como principal reservorio y mosquitos chupadores de sangre del género *Culex* como vectores. Las aves migratorias víricas transportan el virus a regiones lejanas donde lo transmiten de nuevo a los mosquitos ornitófilos del género *Culex*. Muchas especies de mamíferos son tolerantes para el virus del Nilo occidental. Los caballos son particularmente sensibles a la enfermedad pero no participan en el ciclo de transmisión. La fiebre del Nilo occidental es endémica en África, Asia, Europa y Australia. Estudios filogenéticos han puesto de manifiesto la existencia de dos cepas de virus: La estirpe 1 del virus tiene una distribución mundial, y la estirpe 2 del virus es esencialmente africana. La estirpe 1 del virus fue responsable de enzootias en Rumanía (1996), Rusia (1999), Israel (1998-2000) y más recientemente en América del Norte donde el virus nunca se había detectado antes de 1999. Las cepas víricas aisladas durante las recientes epidemias en Israel y Estados Unidos, son más de 99,7% idénticas. En el Medio Oriente y América del Norte, donde ha arraigado el virus, se ha observado una tasa importante de mortalidad de aves entre las aves infectadas, especialmente en *Corvidae*. En América del Norte, más de 4.000 sujetos fueron infectados con el virus del Nilo occidental, de las cuales 250 murieron entre los meses de agosto y diciembre de 2002. En la actualidad, se observa zoonosis en todas las regiones de los Estados Unidos. Por el momento, no existe una vacuna humana o terapia específica contra la fiebre del Nilo occidental.

En las regiones templadas y subtropicales, las infecciones humanas pueden ocurrir durante la temporada de otoño. Cuando un mosquito infectado pica a un sujeto, el período de incubación dura aproximadamente una semana, pero menos del 20% de las personas infectadas con el virus del Nilo occidental nunca siguen manifestaciones clínicas. En su forma benigna, la infección vírica se manifiesta por un estado febril indiferenciado asociado a debilidad muscular, dolores de cabeza y dolor abdominal. En menos de 1% de las personas infectadas, puede ocurrir meningitis o encefalitis aséptica aguda. También se observan esplenomegalia, hepatitis, pancreatitis y miocarditis. La parálisis de matraz similar a un síndrome poliomiélfítico se ha descrito recientemente, pero los casos mortales de encefalitis vírica (5% de los pacientes con graves trastornos neurológicos) se refieren principalmente a personas débiles y ancianos. La transmisión interhumana del virus también se ha observado recientemente en los Estados Unidos en personas que han recibido trasplantes de órganos o que han sido perfundidas con productos sanguíneos contaminados. La transmisión intrauterina del virus se ha descrito en Estados Unidos. El desarrollo de una vacuna humana contra la fiebre del Nilo occidental es una prioridad en vista del hecho de que la zoonosis ha arraigado en América del Norte y es de esperar que se propague en los próximos meses a América Central, América del Sur y el Caribe, donde ya proliferan la fiebre del dengue y la fiebre amarilla.

Por lo tanto, hay una necesidad de péptidos procedentes del virus del Nilo occidental (VNO) y/o del virus del dengue, y más concretamente de polipéptidos o polinucleótidos procedentes de VNO y/o de polipéptidos o polinucleótidos del virus del dengue y su utilización en la preparación de composiciones y vacunas.

La presente invención satisface estas necesidades y también otras necesidades que serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la siguiente memoria.

Davis B. *et al.* (*Journal of Virology*, mayo de 2001, págs. 4040-4047) da a conocer un plásmido de expresión recombinante que expresa las proteínas pre-S y E de una cepa de virus del Nilo occidental. Según esta publicación, una sola inyección intramuscular del vector provocó inmunidad protectora en ratones y caballos.

La solicitud de patente internacional WO 90/01946 describe virus de vacunas que expresan proteínas antigénicas de flavivirus, en especial proteínas antigénicas de un virus tipo 4 del dengue, un virus de la encefalitis B japonesa o de la encefalitis transmitida por garrapatas. En concreto, describe virus de vacunas que contienen una secuencia de

codificación para la membrana de la cápside y antígenos de la envoltura del virus del dengue, que expresan los antígenos correspondientes y la protección permitida de ratones inmunizados.

Wang Z. *et al.* (*Vaccine* 19 (2001)) describe virus recombinantes de sarampión que expresan el HN las glucoproteínas de superficie F de virus del sarampión o las proteínas ENV, GAG o POL del virus de la inmunodeficiencia de simios.

La solicitud de patente internacional WO 2004/001051 con fecha de presentación 30 de junio de 2003, da a conocer el virus recombinante de sarampión que expresa la envoltura o el antígeno pre-M del virus del Nilo occidental. Se da a conocer el polipéptido segregado de la envoltura del virus del Nilo occidental, pero lo da a conocer en este sentido no se beneficia de la fecha de prioridad de dicha solicitud de patente internacional.

Fonseca B. *et al.* (1994 *Vaccine* vol. 12 nº 3) describe virus recombinantes de vacunas que coexpresan glucoproteínas pre-M y E del dengue 1. La publicación dice que los virus obtenidos de este modo provocaron la producción de anticuerpos neutralizantes en ratones inoculados con los virus recombinantes.

Sumario de la invención

La solicitud da a conocer polipéptidos procedentes del virus del Nilo occidental y/o del virus del dengue, y un polipéptido purificado que procede de un antígeno del virus del Nilo occidental o de un antígeno del virus del dengue.

La solicitud describe un anticuerpo purificado policlonal o monoclonal, capaz de unirse específicamente a un polipéptido dado a conocer.

La solicitud da a conocer una secuencia de polinucleótido purificado que codifica el polipéptido dado a conocer y su utilización para detectar la presencia o ausencia de un antígeno del virus del Nilo occidental o un antígeno del virus del dengue en una muestra biológica.

La invención se refiere a un vector vírico recombinante que es un virus recombinante del sarampión que comprende una secuencia de polinucleótidos dada a conocer.

Un objetivo de la invención es un virus recombinante del sarampión capaz de expresar un polipéptido de la invención o que comprende, en su genoma, un polinucleótido dado a conocer.

Aún, otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un componente seleccionado del grupo que consta de:

- un virus recombinante del sarampión de la invención, y

b) un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.

Otro objetivo de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención, como un agente antiviral del Nilo occidental y/o de un antiviral del dengue, o para la preparación de un antiviral del Nilo occidental y/o de una vacuna antiviral del dengue.

Otro objetivo de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un vector vírico recombinante como se define anteriormente.

Además, otro objetivo de la invención se refiere a un procedimiento de producción de un virus recombinante para la preparación de una vacuna contra el virus del Nilo occidental o una vacuna contra el virus del dengue, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

a) proporcionar una célula hospedadora como se ha definido anteriormente;

b) colocar la célula hospedadora de la etapa a) en condiciones que permitan la replicación de un virus recombinante capaz de expresar un polipéptido descrito, y

c) aislar el virus recombinante producido en la etapa b).

La solicitud da a conocer un ensayo de neutralización del virus del Nilo occidental, que comprende las etapas siguientes:

a) poner en contacto células Vero con el virus del Nilo occidental y un anticuerpo;

- b) cultivar dichas células VERO en condiciones que permitan la replicación del virus del Nilo occidental, y
- c) medir la reducción de los focos de replicación del virus del Nilo occidental en dichas células VERO.

5 La solicitud describe un procedimiento para tratar y/o prevenir una infección por VNO o virus del dengue en un animal, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al animal una cantidad eficaz de al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en:

- un polipéptido o un derivado funcional del mismo como se ha definido anteriormente;
- 10 - un anticuerpo como se ha definido anteriormente;
- un vector de expresión como se ha definido anteriormente;
- un polinucleótido o un fragmento del mismo como se ha definido anteriormente;
- un vector vírico recombinante como se ha definido anteriormente; y
- 15 - un virus recombinante del sarampión como se ha definido anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la glucoproteína E segregada del VNO e identificada como SEC. ID. nº 1.

20 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína E segregada del VNO e identificada como SEC. ID. nº 5.

25 La figura 3 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica las glucoproteínas preM más E del VNO e identificada como SEC. ID. nº 2.

La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de las glucoproteínas preM más E del virus del Nilo occidental e identificada como SEC. ID. nº 6.

30 La figura 5 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen preM-E del virus del dengue de tipo 1 e identificada como SEC. ID. nº 4.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos del gen preM-E procedente del virus del dengue de tipo 1 e identificada como SEC. ID. nº 8.

35 La figura 7 es una cartografía esquemática de los plásmidos recombinantes pTM-VP_{Schw} según las formas de realización preferidas de la invención.

40 La figura 8 muestra la expresión de sE_{WNV} por VP recombinante VP_{Schw}-sE_{WNV} y crecimiento del virus en células Vero. (A) Diagrama esquemático de VP_{Schw}-sE_{WNV} y crecimiento del virus. El ADNc IS-98-ST1 que codifica sE_{WNV} se insertó en el genoma de VP Schwarz entre las secuencias *BsiWI* y *BssHII* de la UTA en la posición 2. Se indican los genes de VP: N (nucleoproteína), PVC (fosfoproteína y proteínas V y C), M (matriz), F (fusión), H (hemaglutinina), L (polimerasa). T7: activador de T7 ARN polimerasa; hh: ribozima de cabeza de martillo, T7t: terminador de T7 ARN polimerasa; δ : ribozima del virus delta de la hepatitis (VDH); UTA: unidad de transcripción adicional. (B) Curvas de crecimiento de VP. Se infectaron células Vero con VP_{Schw} (cuadros blancos) o VP_{Schw}-sE_{WNV} (cuadros negros) a una multiplicidad de infección (moi) de 0,01 TCID₅₀/célula. En varios momentos después de la infección, las partículas víricas infecciosas se valoraron como se describe en los Procedimientos. (C) La tinción de inmunofluorescencia de la glucoproteína sE_{WNV} en sincitios de células Vero infectadas con VP_{Schw}-sE_{WNV} fijadas 36 h después de la infección. Las células se permeabilizaron (A, B) o no (C, D) con Triton X-100 y a continuación se inmunotifñeron utilizando HMAF contra el VNO. Ampliación: x 1000. No se observó señal positiva en las células infectadas con VPSchw. (D) Ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP) que muestra la liberación de sE_{WNV} de células infectadas con VPSchw-sE_{WNV}. Se infectaron células Vero con la cepa ES-98-ST1 de VNO (m.o.i de 5) durante 24 h, VPSchw (m.o.i de 0,1), VPSchw-sE_{WNV} (m.o.i de 0,1) durante 40 h, o se simuló la infección (MI). Los sobrenadantes radiomarcados y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos policlonales específicos anti-VP (α -VP) o contra el VNO (α -VNO). Se muestran la glucoproteína E del VNO (punta de flecha blanca) y sE_{WNV} (punta de flecha negra).

60 La figura 9 muestra anticuerpos anti-VPSchw-sE_{WNV} que reconocen la glucoproteína E del VNO. Se infectaron células Vero con la cepa ES-98-ST1 de VNO (VNO) o simuló la infección (sin virus). Los lisados de las células marcadas se inmunoprecipitaron con antiseros mezclados (dilución 1:100) de ratones inoculados con el VNO, VPSchw, VPSchw-sE_{WNV} como se describe en la leyenda de la Fig. 8D. Se utilizaron anticuerpos específicos del anti-virus de la linfocoriomeningitis (VLCM) como referencia negativa. Las glucoproteínas prM y E de la estructura del VNO y las proteínas NS3, NS5, NS2A y NS2B no estructurales se muestran. PC, después de la prueba de provocación.

Las SEC. ID. nº 3, nº 7, nº 13 y nº 14 que originalmente se habían descrito con respecto a la proteína MS1 del VNO no forman parte de la invención.

Descripción detallada de la invención

La solicitud describe el virus del Nilo occidental (VNO) y/o péptidos derivados del virus del dengue, y más específicamente polipéptidos o polinucleótidos procedentes del VNO y/o polipéptidos o polinucleótidos del virus del dengue y su utilización en la preparación de composiciones y vacunas. La presente invención se refiere a composiciones, vacunas y procedimientos para proporcionar una respuesta inmunitaria y/o una inmunidad protectora frente a los animales contra un virus del Nilo occidental o un virus del dengue.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la respuesta a los linfocitos T o al aumento de las concentraciones en el suero de anticuerpos contra un antígeno, o a la presencia de anticuerpos neutralizantes contra un antígeno, tal como un antígeno del VNO o del virus del dengue. La expresión "respuesta inmunitaria" se debe sobreentender que incluye una respuesta humoral y/o una respuesta celular y/o una respuesta inflamatoria.

Un "antígeno" se refiere a una molécula, tal como una proteína o un polipéptido, que contiene uno o más epítomos que estimularán el sistema inmunitario del hospedador para hacer una respuesta específica para el antígeno humoral y/o celular. El término también se utiliza indistintamente con "inmunógeno".

La terminología "protección" o "inmunidad protectora" se refiere en la presente memoria a la capacidad de los anticuerpos séricos y a la respuesta celular provocada durante la inmunización para proteger (parcial o totalmente) contra un virus del Nilo occidental o un virus del dengue. Por lo tanto, un animal inmunizado por las composiciones o vacunas de la invención va a experimentar un crecimiento y una propagación limitados de un virus infeccioso del Nilo occidental o del virus del dengue.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "animal" se refiere a cualquier animal que sea sensible de ser infectado por un virus del Nilo occidental o un virus del dengue. Entre los animales que se sabe que están potencialmente infectados por estos virus, existen, pero no se limitan a, seres humanos, aves y caballos.

1. Polinucleótidos y polipéptidos

En una primera forma de realización, la solicitud describe un polipéptido purificado que se caracteriza porque procede de un antígeno del virus del Nilo occidental o de un antígeno del virus del dengue o de uno de sus derivados funcionales. Como se puede apreciar, una proteína/péptido se dice que "procede" de una proteína/péptido o de un fragmento del mismo cuando tal proteína/péptido comprende por lo menos una parte, sustancialmente similar en su secuencia, a la proteína/péptido natural o a un fragmento de la misma.

El antígeno del virus del Nilo occidental utilizado en el virus recombinante de la presente invención se selecciona preferentemente del grupo que consta de glucoproteína de la envuelta segregada (E), glucoproteínas heterodímeras (PreM-E). Más específicamente, la glucoproteína de la envuelta segregada (E) comprende la secuencia de SEC. ID. nº 5, la glucoproteína heterodímera (PreM-E) comprende la secuencia de SEC. ID. nº 6.

El antígeno del virus del dengue utilizado en el virus recombinante de la invención se selecciona preferentemente del grupo que consta de glucoproteína de la envoltura segregada (E), glucoproteínas heterodímeras (PreM-E). Más específicamente, la glucoproteína heterodímera (PreM-E) comprende la secuencia de SEC. ID. nº 8.

Según una forma de realización preferida, el polipéptido utilizado en el virus recombinante de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de homología, o incluso preferentemente 85% de homología con parte o toda la SEC. ID. nº 5, la SEC. ID. nº 6 o la SEC. ID. nº 8.

Un "derivado funcional", como se entiende generalmente y se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de la proteína/péptido que posee una actividad funcional biológica que es sustancialmente similar a la actividad biológica de toda la secuencia de la proteína/péptido. En otras palabras, se refiere a un polipéptido o a un(os) fragmento(s) del mismo que conserva(n) sustancialmente la misma función biológica que los polipéptidos de las SEC. ID. nº 5, nº 6 o nº 8. Un derivado funcional de una proteína/péptido puede o no puede contener modificaciones después de la traducción tal como hidratos de carbono unidos por enlace covalente, si dicha modificación no es necesaria para el funcionamiento de una función específica. La expresión "derivado funcional" se destina a los "fragmentos", "segmentos", "variantes", "análogos" o "derivados químicos" de una proteína/péptido de la presente memoria, una proteína/péptido se dice que es un "derivado químico" de otra proteína/péptido cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína/péptido, añadiéndose dichos restos mediante la utilización de técnicas bien conocidas en la materia. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad de la proteína/péptido, la absorción, biodisponibilidad, vida media biológica y similares. Cualquier toxicidad no deseable y los efectos secundarios de la proteína/péptido pueden atenuarse e incluso eliminarse utilizando dichos restos.

Además, más preferentemente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente, la misma o la que tiene 100% de identidad con la SEC. ID. nº 5, la SEC. ID. nº 6 o la SEC. ID. nº 8.

Se puede utilizar un programa tal como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara secuencias de aminoácidos y halla la alineación óptima insertando espacios en cualquier secuencia que sea apropiada. Es posible calcular la identidad u homología de aminoácidos para una alineación óptima. Un programa como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al adoptado. Por lo tanto, es posible obtener una comparación donde se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis de identidad se contemplan en la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido(s)" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido(s)" se refiere tanto a cadenas cortas, normalmente denominadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros y a cadenas más largas generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos otros aminoácidos aparte de los 20 aminoácidos codificados por genes. El/los "polipéptido(s)" incluye(n) los modificados por procesos naturales, tales como el tratamiento y otras modificaciones después de la traducción, pero también mediante técnicas de modificación química. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación, y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o variable grado en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos, y los extremos amino o carboxilo. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de un resto hemo, enlace covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, enlace covalente de un lípido o derivado de lípido, enlace covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma carboxilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, tratamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, glucosilación, acoplamiento de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación, selenoilación, sulfatación y adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tales como arginilación y ubiquitinación. Véase, por ejemplo: PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993); Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, páginas 1-12 en POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, ed., Academic Press, Nueva York (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 182:628-848 (1990) y Rattan *et al.*, *Proteins Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992). Los polipéptidos pueden ser ramificados o cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares ramificados pueden proceder de procesos naturales después de la traducción y pueden prepararse también por procedimientos completamente sintéticos.

Con respecto a las proteínas o polipéptidos, la expresión "polipéptido aislado" o "polipéptido aislado y purificado" se utiliza a veces en la presente memoria. Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida por la expresión de una molécula de polinucleótido aislada contemplada por la invención. Alternativamente, este término puede referirse a una proteína que se ha separado suficientemente de otras proteínas con las que, naturalmente, se asociaría, de forma que existen en forma "sustancialmente pura".

La expresión "sustancialmente pura" se refiere a una preparación que comprende por lo menos 50 a 60% en peso del compuesto de interés (p. ej., ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). Más preferentemente, la preparación comprende al menos 75% en peso, y más preferentemente 90 a 99% en peso, del compuesto de interés.

La pureza se mide mediante por métodos apropiados para el compuesto de interés (p. ej., métodos cromatográficos, agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida, análisis de HPLC y similares).

La solicitud describe un polinucleótido purificado que codifica un polipéptido descrito. Por lo tanto, el polinucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico que es por lo menos 65% idéntica, más particularmente 80% idéntica y aún más particularmente 95% idéntica a toda o parte de una cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 2 o nº 4 o fragmentos funcionales de las mismas.

Un "fragmento funcional", como se entiende generalmente y se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una actividad biológica funcional que es sustancialmente similar a la actividad biológica de la secuencia de ácido nucleico entero. En otras palabras, se refiere a un ácido nucleico o a fragmento(s) del mismo que conserva sustancialmente la capacidad de codificación para un polipéptido descrito.

El término "fragmento" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótido (p. ej., ADNc) que es una parte aislada de ácido nucleico objeto construido artificialmente (p. ej., por síntesis química) o mediante la escisión de un producto natural en varias piezas, utilizando endonucleasas de restricción o cizallamiento mecánico, o una parte de un ácido nucleico sintetizado por RCP, ADN polimerasa o cualquier otra técnica de

polimerización bien conocida en la técnica, o expresado en una célula hospedadora por tecnología recombinante de ácido nucleico bien conocidas por un experto en la técnica.

Con relación a los polinucleótidos dados a conocer en la solicitud, el término "polinucleótido aislado" se utiliza a veces. Este término, cuando se aplica a ADN, se refiere a una molécula de ADN que está seterminación de las secuencias con las que está inmediatamente contigua (en las direcciones 5' y 3') en el genoma natural del organismo del que procede. Por ejemplo, el "polinucleótido aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o vector vírico, o integrada en el ADN genómico de un procariota o eucariota. Una "molécula de polinucleótido aislada" puede comprender también una molécula de ADNc.

La "identidad" y la "similitud" de la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos se determina a partir de una alineación global óptima entre las dos secuencias que se comparan. Una alineación global óptima se consigue utilizando, por ejemplo, el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453). "Identidad" significa que un aminoácido o un nucleótido en una posición determinada en un primer polipéptido o polinucleótido es idéntico a un aminoácido o nucleótido correspondiente en un segundo polipéptido o polinucleótido que está en una alineación global óptima con el primer polipéptido o polinucleótido. A diferencia de la identidad, la "similitud" abarca los aminoácidos que son sustituciones conservadoras. Un sustitución "conservadora" es cualquier sustitución que tiene una puntuación positiva en la matriz de sustitución blosum62 (Hentikoff y Hentikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919). Por la expresión "la secuencia A es n% similar a la secuencia B" se entiende que el n% de las posiciones de una alineación global óptima entre las secuencias A y B consiste en restos o nucleótidos idénticos y sustituciones conservadoras. Por la expresión "la secuencia A es n% idéntica a la secuencia B" se quiere decir que n% de las posiciones de una alineación global óptima entre las secuencias A y B consiste en restos o nucleótidos idénticos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier poli-ribonucleótido o poli-desoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Esta definición incluye, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias o de regiones monocatenarias, bicatenarias y tricatenarias, de ADNc, de ARN monocatenario y bicatenario, y de ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, de moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser regiones monocatenarias o, más en general, bicatenarias, o tricatenarias, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, "polinucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en dichas regiones pueden estar en la misma molécula o en moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas las de una o más de las moléculas, pero más en general implican sólo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple cadena a menudo es un oligonucleótido. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido(s)" también incluye los ADN o los ARN como los descritos anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Así pues, los ADN o ARN con ejes centrales modificados para estabilidad o por otras razones son "polinucleótido(s)" tal como ese término se pretende en la presente memoria. Además, los ADN o ARN que comprende bases poco frecuentes, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solamente dos ejemplos, son polinucleótidos en el sentido en que se utiliza el término en este documento. Se apreciará que una gran variedad de modificaciones se han realizado en el ADN y ARN que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. "Polinucleótido(s)" abarca polinucleótidos cortos o fragmentos que comprenden al menos 6 nucleótidos a menudo denominados oligonucleótido(s). El término "polinucleótido(s)", como se emplea en este documento abarca así dichas formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas que presentan la misma función biológica que el polipéptido codificado por cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 4. El término "polinucleótido(s)" también abarca nucleótidos cortos o fragmentos, a menudo denominados "oligonucleótidos", que debido a la mutagenia no son 100% idénticos, pero no obstante el codifican la misma secuencia de aminoácidos.

2. Vectores y células

En una tercera forma de realización, la invención se refiere también a un hospedador, tal como una célula modificada genéticamente, que comprende el virus recombinante según la invención y, más preferentemente, un hospedador capaz de expresar el polipéptido codificado por el polinucleótido comprendido en dicho virus. Aún más preferentemente, la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un vector vírico recombinante tal como se define en la presente memoria a continuación.

La célula hospedadora puede ser cualquier tipo de célula (una estirpe celular de mamífero temporalmente transfectada, una célula primaria aislada, o células de insecto, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Ktuyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*), células vegetales, microorganismos, o una bacteria (tal como *E. coli*). El depósito biológico siguiente correspondiente a la estirpe celular MEF/3T3.Tet-Off/prME.WN # h2 que comprende un vector de expresión que codifica pseudopartículas de la cepa IS-98-ST1 del VNO compuestas por glucoproteínas complejadas de prME se registró en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM) con los números de registro I-3018 el 2 de mayo de 2003.

La solicitud da a conocer un vector de clonación o de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica como se ha definido anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a un montaje de polinucleótidos diseñado para la transducción/transfección de uno o más tipos de células. Los vectores pueden ser, por ejemplo, "vectores de clonación", que están diseñados para el aislamiento, la propagación y la replicación de los nucleótidos insertados, "vectores de expresión" que están diseñados para la expresión de una secuencia de nucleótidos en una célula hospedadora, o un "vector vírico", que está diseñado para producir un virus recombinante o partícula pseudovírica, o "vectores lanzadera", que comprenden los atributos de más de un tipo de vector.

Numerosos vectores adecuados para la transfección estable de células y bacterias están disponibles para el público (p. ej. plásmidos, adenovirus, baculovirus, levaduras baculovirus, virus de plantas, virus adenoasociados, retrovirus, virus del herpes simple, alfavirus, lentivirus), así como procedimientos para construir dichas estirpes celulares. Debe sobreentenderse que la solicitud describe cualquier tipo de vector que comprende cualquiera de las moléculas de polinucleótido descrita.

Según la invención, el vector es un vector vírico recombinante que es un virus recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica como se ha definido anteriormente. El virus recombinante es un virus vivo atenuado o un virus defectuoso del sarampión. Más preferentemente, el virus recombinante del sarampión es por ejemplo la cepa Schwarz del virus del sarampión, que es capaz de expresar un polipéptido tal como se ha definido anteriormente, o comprende, en su genoma, un polinucleótido como se ha definido anteriormente.

3. Anticuerpos

La solicitud da a conocer anticuerpos purificados que se unen específicamente al polipéptido aislado o purificado como se ha definido anteriormente o a fragmentos del mismo. Los anticuerpos se pueden preparar por varios procedimientos que utilizan los polipéptidos descritos anteriormente. Por ejemplo, el antígeno del virus del Nilo occidental o el del dengue, o fragmentos antigénicos de los mismos, pueden administrarse a un animal a fin de provocar la producción de anticuerpos policlonales. Alternativamente, los anticuerpos utilizados como se describe en la presente memoria pueden ser anticuerpos monoclonales, que se preparan utilizando la tecnología del hibridoma (véase, por ejemplo, Hammerling *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981).

Como se mencionó anteriormente, la solicitud da a conocer anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno del Nilo occidental o un antígeno del virus del dengue o fragmentos de los mismos. En particular, la solicitud describe anticuerpos "neutralizantes". Por anticuerpos "neutralizantes" se entiende anticuerpos que interfieren con cualquiera de las actividades biológicas de cualquier antígeno del VNO o antígeno del virus del dengue. Cualquier ensayo estándar conocido por un experto en la técnica puede utilizarse para evaluar anticuerpos neutralizantes en potencia. Una vez producidos, los anticuerpos monoclonales y policlonales se prueban preferentemente en el reconocimiento de proteínas específicas del VNO o del virus del dengue por inmunotransferencia Western, análisis de inmunoprecipitación o cualquier otro procedimiento adecuado.

Los anticuerpos que reconocen proteínas del VNO o del virus del dengue que expresan células y anticuerpos que reconocen específicamente proteínas de VNO o del virus del dengue (o fragmentos funcionales de las mismas), tales como los descritos en la presente memoria, se consideran útiles para la invención. Dicho anticuerpo se puede utilizar en cualquier procedimiento de inmunodetección estándar para la detección, cuantificación y purificación de proteínas del VNO o del virus del dengue. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal y puede modificarse para diagnóstico. Los anticuerpos pueden utilizarse, por ejemplo, en un inmunoanálisis para controlar niveles de expresión de proteínas del VNO o del virus del dengue, para determinar la cantidad de proteínas del virus del Nilo occidental o del virus del dengue o de fragmentos de la misma en una muestra biológica y evaluar la presencia o no de un VNO o de virus del dengue. Además, los anticuerpos se pueden acoplar a compuestos para utilizaciones de diagnóstico y/o terapéuticas, tales como partículas de oro, fosfatasa alcalina, peroxidasa para detección por la imagen y terapia. Los anticuerpos también pueden marcarse (p. ej., inmunofluorescencia) para una detección más fácil.

Con respecto a los anticuerpos descritos en la solicitud, la expresión "se une específicamente a" se refiere a anticuerpos que se unen con una afinidad relativamente elevada a uno o más epítomos de una proteína de interés, pero que no reconocen sustancialmente y se unen a otras moléculas aparte de la(s) de interés. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "afinidad relativamente alta" significa una afinidad de unión entre el anticuerpo y la proteína de interés de por lo menos 10^6 M^{-1} , y preferentemente de por lo menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , y aún más preferentemente 10^8 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} . La determinación de dicha afinidad se realiza preferentemente en condiciones estándar de inmunoanálisis de unión competitiva, que son de conocimiento común para un experto en la técnica. Como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen todas las posibilidades mencionadas en lo sucesivo: anticuerpos o fragmentos de los mismos obtenidos por purificación, tratamiento proteolítico o por ingeniería genética, montajes artificiales que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos y montajes artificiales diseñados para imitar la unión de anticuerpos o fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos

se exponen en Colcher *et al.* (*Q. J. Med. Nucl.* 1998; 42: 225-241). Incluyen anticuerpos completos, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos ScFv, otros fragmentos, péptidos RDC y miméticos. Estos pueden obtenerse fácilmente y prepararse por expertos en la técnica. Por ejemplo, la digestión enzimática se puede utilizar para obtener fragmentos F(ab')₂ y Fab sometiendo una molécula de IgG a la escisión con pepsina o papaína respectivamente. Se dan a conocer también anticuerpos recombinantes.

Alternativamente, el anticuerpo descrito puede ser un derivado de anticuerpo. Dicho anticuerpo puede comprender una región de unión al antígeno ligada o no a una región que no es de inmunoglobulina. La región de unión al antígeno es un dominio variable de cadena ligera o un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo. Por lo general, el anticuerpo comprende los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada, que pueden insertarse en los montajes tales como los fragmentos Fv monocatenarios (scFv), los fragmentos de Fv estabilizados por puentes disulfuro (dsFv), fragmentos scFv poliméricos, diacuerpos, minicuerpos u otras formas relacionadas (Colcher *et al.* *Q. J. Med. Nucl.* 1998; 42: 225-241). Dicho anticuerpo modificado puede ser preferible a veces, ya que carece de la porción Fc del anticuerpo natural que puede unirse a varios efectores del sistema inmunitario y provocar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un ser humano o un animal. En efecto, los anticuerpos modificados normalmente no conducen a la enfermedad por inmunocomplejos y a la activación del complemento (reacción de hipersensibilidad tipo III).

Alternativamente, una región sin inmunoglobulina se fusiona a la región de unión al antígeno del anticuerpo descrito. La región sin inmunoglobulina suele ser un resto sin inmunoglobulina y puede ser una enzima, una región procedente de una proteína con especificidad de unión conocida, una región procedente de una toxina de proteína o de hecho de cualquier proteína expresada por un gen, o una entidad química que presenta actividad(es) inhibitorias o de bloqueo contra las proteínas del VNO o del virus del dengue. Las dos regiones de ese anticuerpo modificado pueden conectarse por una secuencia enlazadora escindible o permanente.

Preferentemente, el anticuerpo descrito es una inmunoglobulina humana o animal, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgE o IgD que lleva regiones variables (híbridas) de rata o ratón o RDC (humanizadas o "animalizadas"). Además, el anticuerpo descrito también se puede conjugar con cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica a fin de proporcionar, por ejemplo, una administración específica y una retención prolongada del anticuerpo, ya sea en un área local específica o para una aplicación general.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo procedente de un anticuerpo no humano, por lo general murino, que conserva o mantiene sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo paterno pero que es menos inmunógeno en seres humanos. Esto puede conseguirse por varios procedimientos, incluyendo (a) injertar sólo las RDC no humanas en marco humano y regiones constantes con o sin retención de los restos estructurales críticos, o (b) trasplantar los dominios completos de variable no humana, pero "encubriéndolos" con una sección similar a la humana mediante la sustitución de los restos superficiales. Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se ha mencionado anteriormente, el anticuerpo descrito es inmunológicamente específico para el polipéptido utilizado en el virus recombinante de la presente invención y en derivados inmunológicos del mismo. Como se utiliza en la presente memoria, el término "derivado inmunológico" se refiere a un polipéptido que posee una actividad inmunológica que es sustancialmente similar a la actividad inmunológica del polipéptido entero, y dicha actividad inmunológica se refiere a la capacidad de estimular la producción de anticuerpos inmunológicamente específicos para las proteínas VNO o del virus del dengue o derivados de las mismas. La expresión "derivado inmunológico" por lo tanto abarca "fragmentos", "segmentos", "variantes" o "análogos" de un polipéptido.

4. Composiciones y vacunas

Los polipéptidos, los polinucleótidos que codifican a los mismos, el virus recombinante del sarampión producido según la invención, se puede utilizar de muchas maneras para el tratamiento o la prevención del VNO o el virus del dengue.

La presente invención se refiere a una composición para producir una respuesta inmunitaria o una inmunidad protectora contra un VNO o un virus del dengue. Según un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a una vacuna para prevenir y/o tratar una infección por VNO o virus del dengue. Como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" se refiere a un proceso mediante el cual los síntomas de una infección por VNO o por un virus del dengue se alivian o eliminan completamente. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "prevención" se refiere a un proceso por el que se obstruye o se retarda la infección por el VNO o por el virus del dengue. La composición o la vacuna de la invención comprende un virus recombinante del sarampión como se ha definido anteriormente y un vehículo aceptable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "un vehículo aceptable" significa un vehículo para contener el virus recombinante del sarampión de la invención que se puede inyectar en un animal hospedador sin efectos desfavorables. Los vehículos adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, partículas de oro, agua esterilizada, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tamponadas. Los vehículos pueden incluir agentes

auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colorantes y similares.

Se pueden añadir agentes adicionales a la composición y a la vacuna de la invención. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender también agentes tales como fármacos, inmunoestimulantes (tales como interferón α , interferón β , interferón γ , factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina 2 (IL2), interleucina 12 (IL12) y oligonucleótidos CpG), antioxidantes, tensioactivos, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes tamponantes, dispersantes, propulsores y conservantes. Para preparar dichas composiciones, pueden utilizarse procedimientos bien conocidos en la técnica.

La cantidad de virus recombinante del sarampión en las composiciones o en las vacunas de la presente invención es preferentemente una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz del virus recombinante del sarampión de la invención es la cantidad necesaria que permite a la misma llevar a cabo su función inmunológica sin causar, demasiados efectos negativos en el hospedador al que se administra la composición. La cantidad exacta de virus recombinante del sarampión que debe utilizarse y la composición/vacuna administrada variará según factores tales como el tipo de afección que va a tratarse, el modo de administración, así como los demás ingredientes de la composición.

5. Procedimientos de utilización

En una séptima forma de realización, la solicitud describe procedimientos para tratar y/o prevenir una enfermedad o infección asociada al VNO o al virus del dengue en un animal. El procedimiento comprende la etapa de administrar al animal una cantidad eficaz de por lo menos un virus recombinante del sarampión de la invención.

- un virus recombinante del sarampión de la invención.

La vacuna, y la composición de la invención pueden administrarse a un animal por varias vías de administración. Por ejemplo, la composición se puede administrar en forma de preparaciones inyectables estériles, tales como suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables y estériles. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la materia utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles también pueden ser soluciones o suspensiones inyectables estériles en diluyentes o disolventes no tóxicos parenteralmente aceptables. Éstos se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, por infusión o por vía oral. La vacuna y la composición de la invención también se pueden formular en forma de cremas, pomadas, lociones, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos o polvos para administración tópica. También puede administrarse en las vías respiratorias de un sujeto por medio de un dispensador de aerosol presurizado, un pulverizador nasal, un nebulizador, un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco o una cápsula. Las dosis adecuadas variarán, dependiendo de factores tales como la cantidad de cada uno de los componentes en la composición, el efecto deseado (corto o largo plazo), la vía de administración, la edad y el peso del animal que ha de tratarse. Cualesquiera otros procedimientos bien conocidos en la técnica pueden utilizarse para administrar la vacuna y la composición de la invención.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir un virus recombinante para la preparación de una vacuna contra el virus del Nilo occidental o una vacuna contra el virus del dengue, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- proporcionar una célula hospedadora como se ha definido anteriormente;
- colocar la célula hospedadora de la etapa a) en condiciones que permiten la replicación de un virus recombinante capaz de expresar un polipéptido según la invención, y
- aislar el virus recombinante producido en la etapa b).

La solicitud describe un ensayo de neutralización del virus del Nilo occidental. Por consiguiente, el ensayo comprende las etapas siguientes:

- poner en contacto células Vero con el virus del Nilo occidental y un anticuerpo;
- cultivar dichas células VERO en condiciones que permiten la replicación del virus del Nilo occidental, y
- medir la reducción de focos de replicación del virus del Nilo occidental en dichas células VERO.

Ejemplos

La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Estos ejemplos son ilustrativos de la amplia gama de aplicación de la presente invención y no están destinados a limitar su alcance. Aunque pueden utilizarse algunos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica para el ensayo de la presente invención, se describen los procedimientos y

materiales preferidos.

Ejemplo 1: Construcción de virus del sarampión (VP) que expresan el VNO y antígenos DEN1

Para poner a prueba su capacidad como vacuna experimental contra la infección por el VNO, se construyeron virus recombinantes del sarampión de Schwarz (VP) que expresan estos antígenos de VNO y DEN-1. Los diferentes genes se introdujeron en una unidad de transcripción adicional en el ADNc del VP Schwarz que los inventores clonaron previamente (pTM-VPSchw) (Solicitud de Patente Europea nº 02291551.6 presentada el 20 de junio de 2002). Después de rescate de los diferentes virus recombinantes del sarampión Schwarz que expresan los genes VNO y DEN-1, se pondrá a prueba su capacidad para proteger a los ratones de una prueba de provocación letal intraperitoneal con VNO y a monos de la infección por virus del dengue.

Vector VP

La vacunación masiva con vacunas vivas atenuadas ha reducido la incidencia del sarampión y sus complicaciones drásticamente desde que se introdujo en los años 60. Por ahora, la vacuna se ha administrado a miles de millones de personas y es segura y eficaz. Provoca una inmunidad muy eficiente, de por vida a CD4, CD8 y humoral después de una sola inyección de 104 TCID₅₀. Además, es fácil de producir, económica, y los medios para administrarla a todo el mundo ya existen. La seguridad de esta vacuna se debe a varios factores: i) La estabilidad del genoma de VP que explica que la reversión a la patogenicidad nunca se ha observado. ii) La imposibilidad del genoma de VP para integrarse en los cromosomas del hospedador ya que la replicación vírica es exclusivamente citoplasmática. iii) La producción de la vacuna sobre fibroblastos primarios de embrión de pollo seguros. Así pues, VP viva y atenuada podría proporcionar un vector de vacunación pediátrica seguro y eficiente.

VP pertenece al género *Morbillivirus* en la familia *Paramyxoviridae*. El VP Edmonston se aisló en 1954 (32), se atenuó en serie en células primarias humanas de riñón y amnióticas, después se adaptó a fibroblastos de embrión de pollo (CEF) para producir semillas de Edmonston A y B (ver (7, 8) para examen). Edmonston B fue autorizada en 1963 como la primera vacuna contra el VP. Más atenuaciones de Edmonston A y B en CEF produjeron los virus de Schwarz y Moraten más atenuados (33) cuyas secuencias se ha demostrado recientemente que son idénticas (34, 35). Al ser "reactogénica", la vacuna Edmonston B se abandonó en 1975 y se sustituyó por la vacuna de Schwarz/Moraten. Esta es actualmente la vacuna utilizada más frecuentemente contra el sarampión (7,8).

En un trabajo anterior, los inventores construyeron un ADNc infeccioso a partir de un lote de vacuna Schwarz comercial, una vacuna contra el VP ampliamente utilizada (Solicitud de Patente Europea nº 02291551.6 presentada el 20 de junio 2002). Los extremos del ADNc se modificaron genéticamente a fin de maximizar el rendimiento de virus durante el rescate. Un sistema de rescate colaborador a base de células descrito anteriormente fue adaptado cultivando conjuntamente células transfectadas en fibroblastos primarios de embrión de pollo, las células utilizadas producen la vacuna Schwarz. Después de dos atenuaciones la secuencia del virus rescatado era idéntica a la del ADNc y de la secuencia publicada de Schwarz. Dos unidades de transcripción adicionales (UTA) se introdujeron en el ADNc para la clonación de material genético extraño. La inmunogenicidad del virus rescatado se estudió en ratones transgénicos para el receptor de CD46 VP y en macacos. Los valores de anticuerpos en los animales inoculados con dosis bajas del virus rescatado fueron idénticos a los obtenidos con la vacuna comercial VP de Schwarz. En cambio, la inmunogenicidad de un clon de VP procedente de la cepa Edmonston anteriormente descrita fue mucho menor. Este nuevo clon molecular permite la producción de vacuna VP sin tener que depender de las existencias de semillas. Las UTA, permiten la producción de vacunas recombinantes basadas en una cepa de vacuna aprobada, eficaz y utilizada en todo el mundo.

Ejemplo 2: Construcción de plásmidos SCHWARZ VP-VNO RECOMBINANTES

1) Glucoproteína E segregada del VNO

El gen env del VNO que codifica la forma segregada de la proteína se generó por RT-PCR por ampliación de ARN vírico purificado a partir de partículas víricas (cepa IS-98-ST1 de VNO). La secuencia específica se amplió utilizando la PfuTurbo ADN polimerasa (Stratagene) y cebadores específicos que contienen secuencias únicas para la clonación posterior en el vector pTM-VPSchw: VP-WNEnv5 5'-TATCGTACGATGAGAGTTGTGTTGTCTGCTGCTA-3' (SEC. ID. nº 9) (secuencia BsiWI subrayada) y VP-WNEnv3 5'-ATAGCGCGCTTAGACAGCCTTCCCAACTGA-3' (SEC. ID. nº 10) (secuencia BssHII subrayada). Un codón de inicio y uno de terminación se añadieron a ambos extremos del gen. Toda la secuencia generada es 1380 nucleótidos de longitud (véase la figura 1), incluyendo los codones de inicio y de terminación y respeta la "regla de los seis", que establece que el número de nucleótidos del genoma de VP debe ser divisible por 6 (28, 29). La proteína Env generada de este modo contiene su péptido señal en el terminal N (18 aa) y ninguna región transmembrana. Por lo tanto, representa los aminoácidos 275-732 en poliproteína VNO y tiene la secuencia mostrada en la figura 2.

2) preM más glucoproteínas E del VNO

El gen VNO que codifica la preM más glucoproteínas E se generó por ampliación por PCR del plásmido pVL prM-E. 55.1 (clon CNCM I-2732 depositado el 15 de octubre de 2001). Este plásmido de expresión codifica las proteínas pre-M y E del VNO (cepa IS-98-ST1). La secuencia se amplió utilizando la PfuTurbo ADN polimerasa (Stratagene) y cebadores específicos que contienen secuencias únicas para la clonación posterior en el vector pTM-VPSchw: VP-WNpreME5 5'-TATCGTACGATGCAAAAGAAAGAGGAGGAAAG-3' (SEC. ID. nº 11) (secuencia BsiWI subrayada) y VP-WNpreME3 5'-ATAGCGCGCTTAAGCGTGACGTTACGGAG-3' (SEC. ID. nº 12) (secuencia BssHII subrayada). Un codón de inicio y uno de terminación se añadieron a ambos extremos del gen. Toda la secuencia generada es de 2076 nucleótidos de longitud (véase la figura 3), incluyendo los codones de inicio y de terminación y respeta la "regla del seis" del VP. En este montaje, la parte del terminal C de la proteína C sirve como una señal de transposición de prM. Ambas glucoproteínas víricas preM y E son glucoproteínas transmembranarias tipo I. Se supone que el VNO env Prem-E que expresan VP producirán y liberarán formas multiméricas de heterodímeros de Prem-E que presentan gran potencial inmunógeno. El montaje representa los aminoácidos 302-789 en la poliproteína del VNO y tiene la secuencia mostrada en la figura 4.

3. Proteína preM-E del virus del dengue de tipo 1

El gen del virus del dengue que codifica las glucoproteínas preM más E se generó por ampliación por PCR del plásmido pVL pIND/[prM+E] (clon 2) (COURAGEOT, M.P., *et al.* 2000, A-glucosidasa inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* 74:564-572). Este plásmido codifica las glucoproteínas pre-M y E del virus DEN-1 (cepa FGA/89). La secuencia se amplió utilizando la PfuTurbo ADN polimerasa (Stratagene) y cebadores específicos que contienen secuencias únicas para la clonación posterior en el vector pTM-VPSchw: VP-DEN1preME5 5'-TATCGTACGATGAACAGGAGGAAAAGATCCGTG-3' (SEC. ID. nº 15) (secuencia BsiWI subrayada) y VP-DEN1preME3 5'-ATAGCGCGCTTAACCATGACTCCTAGGTACAG-3' (SEC. ID. nº 16) (secuencia BssHII subrayada). Un codón de inicio y de terminación se añadieron a ambos extremos del gen. Toda la secuencia generada es 2040 nucleótidos de longitud (ver figura 5), incluyendo los codones de inicio y de terminación y respeta la "regla de los seis" del VP. En este montaje, la parte del terminal C de la proteína C sirve como una señal de transposición de preM. Tanto glucoproteínas víricas preM como E son glucoproteínas transmembranarias tipo I. Se supone que DEN-1 env que expresa VP producirá y liberará formas poliméricas de heterodímeros Prem-E que presentan gran potencial inmunógeno. El montaje representa los aminoácidos 95-773 en la poliproteína DEN-1 y tiene la secuencia mostrada en la figura 6.

Los mismos inmunógenos se pueden preparar de la misma manera a partir de los serotipos DEN-2, DEN 3 y DEN-4.

4) Inserción en el vector Schwarz del VP

Las secuencias nucleotídicas VNO y DEN-1 diferente se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron para comprobar que no se introdujeron mutaciones. Después de digestión de los plásmidos pCR2.1-TOPO con BsiWI/BssHII, los fragmentos de ADN se clonaron en el vector pTM-VPSchw en posición 2 de la UTA dando los plásmidos: pTM-VPSchw-EnvWNV, pTM-VPSchw-preMEwnv y pTM-VPSchw-preMEDEN-1 según la figura 7.

Ejemplo 3: Recuperación de virus VPSCHW-ENVWNV, VPSCHW-PREMEWNV y VPSCHW-NS1WNV recombinantes

Para recuperar virus recombinantes de Schwarz A partir de los plásmidos, se utilizó el sistema de rescate basado en linfocitos T cooperadores descrito por Radecke *et al.* (11) y modificado por Parks *et al.* (30). Linfocitos T colaboradores humanos que expresan de manera estable la T7 ARN polimerasa y las proteínas N y P del sarampión (células 293-3-46, donación gentil de M.A. Billeter) se transfectaron utilizando el procedimiento de fosfato de calcio con los plásmidos pTM-VPSchw-EnvWNV, pTM-VPSchw-preMEwnv (5 µg) y un plásmido que expresa el gen L de la VP polimerasa (pEMC-La, 20 ng, donación gentil de M.A. Billeter). Después de la incubación durante la noche a 37°C, el medio de transfección se reemplazó por medio reciente y se aplicó un choque térmico (43°C durante dos horas) (30). Después de dos días de incubación a 37°C, las células transfectadas se transfirieron sobre una capa de células CEF y se incubaron a 32°C para evitar cualquier adaptación de la vacuna Schwarz que se seleccionó originalmente en células CEF y se cultiva actualmente en estas células por consideraciones de seguridad. El virus infeccioso se recuperó fácilmente entre 3 y 7 días después del cultivo conjunto. Aparecieron sincitios ocasionalmente en CEF, pero no de forma sistemática. Los virus recombinantes se rescataron también mediante la misma técnica después del cultivo conjunto de células auxiliares transfectadas 293-3-46 a 37°C con células Vero de primate (riñón de mono verde africano). En este caso, aparecieron sistemáticamente sincitios en todas las transfecciones después de 2 días de cultivo conjunto. A fin de aumentar el rendimiento de rescate y debido a que estos virus recombinantes se utilizarán en experimentos con ratones, se utilizaron células Vero como células diana en lugar de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) (Solicitud de Patente Europea nº 02291551.6 presentada el 20 de junio de 2002). Los virus recombinantes se atenuaron dos veces en células Vero. Los inventores han demostrado previamente que dos atenuaciones del virus Schwarz en células Vero no cambiaron sus capacidades inmunógenas en macacos (Solicitud de Patente Europea nº 02291551.6 presentada el 20 de junio de 2002).

Se prepararon virus recombinantes como se ha descrito anteriormente y la expresión del transgén en células infectadas se comprobó por inmunofluorescencia. Para detectar la expresión de glucoproteínas de la envoltura del VNO, se utilizaron antisueros de ratones resistentes a la infección del VNO (solicitud de patente internacional WO 02/081741).

Ejemplo 4: Vacunación contra el virus del Nilo occidental

La enfermedad del Nilo occidental ha aparecido recientemente como una importante infección por flavivirus transmitido por mosquitos con numerosos casos mortales de encefalitis humana, por lo que urge desarrollar una vacuna segura y eficaz. La vacuna contra el virus del sarampión (VP), un virus vivo con ARN atenuado, es una de la vacunas humanas más seguras y eficaces desarrollada hasta ahora. La cepa de la vacuna Schwarz de VP se puede utilizar como un vector para inmunizar contra heterólogo vírico, con lo que se ofrece una novedosa y atractiva estrategia de vacunación contra el virus del Nilo occidental (VNO). Los autores evaluaron la eficacia de un vector procedente de la vacuna contra el sarampión Schwarz que expresa la forma segregada de la glucoproteína E de la envoltura del VNO en un modelo de ratón. La vacunación induce grandes valores de anticuerpos neutralizantes específicos anti VNO y protección de una prueba de provocación letal del VNO. La administración pasiva con antisueros de ratones inmunizados también proporcionó protección, incluso después del prueba de provocación con dosis elevadas de VNO. El ejemplo 4 es el primer informe de que un virus recombinante, vivo y atenuado de sarampión proporciona inmunidad protectora eficaz contra una enfermedad vírico heteróloga. La inducción de inmunidad protectora demuestra que VP vivo atenuado que expresa la forma segregada de la glucoproteína E es una vacuna eficaz contra la enfermedad del Nilo occidental.

Materiales y procedimientos

Células y virus. Células Vero-NK (riñón de mono verde africano) se mantuvieron en DMEM Glutamax (Invitrogen) enriquecido con suero fetal bovino (FBS) inactivado térmicamente al 5%. Las células 293-3-46 colaboradoras utilizadas para el rescate vírico (11) (donación gentil de M. Billeter, Universidad de Zurich) se cultivaron en DMEM/FBS al 10% y enriquecido con 1,2 mg de G 418 por ml. La cepa ES-98-ST1 del VNO (número de entrada en GenBank AF 481864) se propagó en monocapas de células AP61 de mosquito *Aedes pseudoscutellaris* (13). La purificación en gradientes de sacarosa, y la valoración del virus en células AP61 por ensayo de inmunodetección del foco (FIA) se realizaron como se ha descrito anteriormente (13, 27).

Antisueros de ratón contra el VNO. Líquido ascítico de ratón hiperinmune (por sus siglas en inglés, HMAF) contra el VNO se obtuvo por inmunización repetida de ratones adultos con la cepa SE-98-ST1 del VNO seguido de inoculación de sarcoma 180. Se obtuvieron anticuerpos contra el VNO policlonales de ratón por inmunización de ratones BALB/c-MBT adultos congénicos con 10^3 FFU de IS-98-ST1 como se ha descrito anteriormente (13). Se recogió antisuero con VNO un mes después de la sensibilización.

Construcción del plásmido PTM-VPSchw-sE_{WNV}. El plásmido pTM-VPSchw que contiene un ADNc de VP infeccioso correspondiente al anti-genoma de la cepa de vacuna contra el VP Schwarz/Moraten ampliamente utilizada se ha informado en otras partes (10). Se introdujeron más unidades de transcripción en el genoma vírico para convertirlo en un vector de expresión de proteínas extrañas. Para construir pTM-VPSchw-sE_{WNV}, ARN genómico del VNO se extrajo de viriones IS-98-ST1 muy purificados y se transcribió a la inversa utilizando el kit Titan One-Step RT-PCR (Roche Molecular Biochemicals) según las instrucciones del fabricante. Un fragmento de RT-PCR que codifica la señal E de transposición interna (prM-151 a prM-166) seguido por el ectodominio y la región troncal de la proteína E (E-1 a E-441) se generó utilizando el cebador en 5' VP-WNEnv5 5'-TATCGTACGATGAGAGTTGTGTTTGTCTGCTA-3' (SEC. ID. nº 9) que contiene una secuencia de restricción *BsiWI* (subrayada) y el cebador en 3' VP-WNEnv3 5'-ATAGCGCGCTTAGACAGCCTTCCCAACTGA-3' (SEC. ID. nº 10) que contiene una secuencia de restricción *BssHII* (subrayada). Un codón de inicio y uno de terminación se añadieron a ambos extremos del gen. La secuencia respeta la «regla de los seis», que estipula que el número de nucleótidos del genoma de VP debe ser múltiplo de 6 (28, 29). El producto de PCR se inserta directamente en el plásmido pCR2.1-TOPO (kit de clonación TOPO TA, Invitrogen) según las instrucciones del fabricante para dar TOPO-sE_{WNV}. Un fragmento de 1,4-kb que contiene la proteína truncada E con secuencia señal de transposición se escindió del TOPO-sE_{WNV} utilizando *BsiWI* y *BssHII* y a continuación se insertó en pTM-VPSchw-UTA2 digerido con *BsiWI*/*BssHII* que contiene la unidad de transcripción adicional (UTA) entre los genes P y M del genoma del VP de Schwarz (10, 11). El plásmido resultante se diseñó pTM-VPSchw-sE_{WNV} (denominado pTM-VPSchw-EnvWVN en los ejemplos anteriores). Todas las montajes se verificaron por secuenciación automatizada.

Rescate de virus VPSchw-sE_{WNV} recombinante a partir del ADNc clonado. El rescate del VP de Schwarz recombinante a partir del plásmido pTM-VPSchw-sE_{WNV} se realizó utilizando el sistema de rescate a base de linfocitos T colaboradores descrito por Radecke *et al.* (11) y modificado por Parks *et al.* (30). En resumen, T7 ARN polimerasa que expresan de manera estable linfocitos T cooperadores humanos y proteínas N y P del sarampión (células 293-3-46, donación gentil de M.A. Billeter, Universidad de Zürich) se transfectaron con 5 µg de pTM-VPSchw-sE_{WNV} y 0,02 µg de pEMC-La que expresa el gen L de la VP polimerasa (donación gentil de M.A. Billeter)

utilizando el procedimiento del fosfato de calcio. Después de la incubación toda la noche a 37°C, se aplicó un choque térmico durante 2 horas a 43°C. Después de dos días de incubación a 37°C, las células transfectadas se transfirieron sobre una monocapa de células Vero. Las células Vero se utilizaron como células diana en lugar de los fibroblastos de embrión de pollo (por sus siglas en inglés, CEF) habituales a fin de aumentar el rendimiento de virus rescatado. Los inventores han demostrado previamente que dos atenuaciones del virus de Schwarz en células Vero no cambiaban su inmunogenicidad en primates (10). Los sincitios que aparecieron después de 2 a 3 días de cultivo conjunto se transfirieron a pocillos de 35 mm de células Vero, a continuación se expandieron en matraces de 75 y, a continuación 150 cm² en DMEM/FBS al 5%. Cuando los sincitios alcanzaron 80 a 90% de confluencia (generalmente 36 a 48 h después de la infección), se rasparon las células en un pequeño volumen de OptiMEM (Invitrogen) y se congelaron y descongelaron una vez. Después de centrifugación a baja velocidad para sedimentar los restos celulares, el sobrenadante, que contenía virus, se almacenó a -80°C. Los valores de VP_{Schw}-sE_{WNV} se determinó por un ensayo de dilución de límite del punto final en células Vero. Se calcularon las dosis infecciosas en el cultivo tisular al 50% (TCID₅₀) utilizando el procedimiento de Kärber.

Ensayo de radioinmunoprecipitación. Se privó de alimento a las células Vero durante 1 h con DMEM sin metionina y cisteína (ICN Biomedicals) y se marcaron 3 h con 250 µCi/ml de marcador Tran³⁵S (ICN Biomedicals). Las células se lisaron con tampón RIPA (TrisCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato al 0,5%, Triton X-100 al 1%) enriquecido con una mezcla de inhibidores de proteasa. El ensayo RIP se realizó como se ha descrito anteriormente (31). Las muestras se analizaron por SDS-15% PAGE en condiciones reductoras.

Experimentos con ratones. Se produjeron ratones CD46-IFNAR como se ha descrito anteriormente (10). Se adquirieron ratones BALB/c adultos en Janvier Laboratories (Le Genest St. Isle, Francia). Los ratones se alojaron en condiciones específicas sin patógenos en el Instituto Pasteur. A 5 ratones CD46-IFNAR de 6 semanas se les inoculó por vía ip con 10⁴ ó 10⁶ TCID₅₀ de VP. Se realizó la prueba de provocación aguda con VNO por inoculación intraperitoneal de la cepa IS-98-ST1 de VNO neurovirulento (ipLD₅₀ = 10) en tampón de solución salina de fosfato modificado por Dulbecco (por sus siglas en inglés, DPBS) enriquecido con 0,2% de albúmina de suero bovino (ASB), pH 7,5 (Sigma Chemical Co.). Se hizo un seguimiento diario a los animales para detectar signos de morbilidad y mortalidad. Todos los experimentos se aprueban y se realizará de conformidad con las directrices de la Office Laboratory Animal Care en el Instituto Pasteur.

Prueba de vacunación contra WN con refuerzo antigénico. Se vacunaron adultos ratones CD46^{+/-} IFN-α/βR^{-/-} durante un periodo de cuatro semanas con el virus VP-WN sE a una dosis de 10⁴ DCIP50 (que es una dosis recomendada para seres humanos) y se proporcionó un refuerzo antigénico mediante pseudopartículas purificadas de VNO que se habían sido segregadas por las células MEF/3T3.Tet-Off/WN prME # h2.

Respuesta humoral. Para evaluar la respuesta de anticuerpos específicos en el suero, se extrajo sangre de los ratones por vía periorbital en diferentes momentos después de la inoculación. La detección de anticuerpos anti-VP se realizó por ELISA (Trinity Biotech, USA) como se ha descrito anteriormente (10). Se utilizó un conjugado anticuerpo-anti-HRP de ratón (Amersham) como anticuerpo secundario. El valor del punto final se calculó como el recíproco de la última dilución que da un valor positivo de densidad óptica. La presencia de anticuerpos contra el VNO se evaluó por ELISA como se describió anteriormente (13). En resumen, las placas de microvaloración se recubrieron con 106 FFU de la cepa IS-98-ST1 del VNO muy purificada y después se incubaron con diluciones de sueros de ratón. Un suero de prueba se consideraba positivo si su densidad óptica era el doble de la densidad óptica de los sueros de los ratones de referencia inmunizados.

Ensayo de neutralización. Se detectaron anticuerpos neutralizantes contra el VNO mediante una prueba FRNT. Los sueros de cada grupo de ratones se agruparon y se inactivaron térmicamente a 56°C durante 30 min. Las células Vero se sembraron en placas de 12 pocillos (1,5 x 10⁵ células/pocillo) durante 24 h. Las muestras de suero de ratón se diluyeron en serie en MEM Glutamax/FBS al 2%. Las diluciones (0,1 ml) se incubaron a 37°C durante 2 h y con agitación suave con un volumen igual de la cepa VNO ES-98-ST1 que contiene ~ 100 FFU. La infectividad restante se ensayó a continuación en monocapa de células Vero superpuesta con Glutamax MEM/FBS al 2% que contiene 0,8% (p/v) carboximetilcelulosa (BDH). Después de 2 días de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se realizó FIA con HMAF contra el VNO como se ha descrito anteriormente (27). La mayor dilución en el suero probada que reducía el número de FFU por lo menos el 90% (FRNT₉₀) se consideró como el valor de punto final.

Transferencia pasiva de antisueros. Se transfirieron antisueros mezclados a ratones BALB/c hembra de 6 semanas por vía intraperitoneal. Los ratones recibieron una inyección de 0,1 ml de diluciones en serie de muestras mezcladas de suero en DPBS/ASB al 0,2% un día antes de la inoculación del VNO. Los ratones expuestos a la prueba de provocación se observaron durante más de 3 semanas.

Exposición de los resultados

Desde su introducción en los Estados Unidos en 1999, la infección por el virus del Nilo occidental (VNO) ha sido reconocida como una de las más graves enfermedades transmitidas por mosquitos en el hemisferio occidental, que produce la enfermedad neurológica grave (meningoencefalitis y síndrome de tipo poliomielítico) en seres humanos. (3). En los últimos 4 años, el VNO se había extendido por América del Norte, América Central y el Caribe

(1, 2). Se supone que llegará a Sudamérica en los próximos años. Desde 2002, los brotes en EE.UU. se caracterizaron por un aumento aparente en la gravedad de la enfermedad humana con 13.000 casos y 500 muertes. Aunque predomina la transmisión del VNO por mosquitos, el VNO se transmite también por transfusión sanguínea, donaciones de órganos y a través de la placenta al feto (3). La prevención de la encefalitis del Nilo occidental es una nueva prioridad de la salud pública y es imprescindible desarrollar una vacuna (3, 4, 5). Hasta ahora no se ha aprobado ninguna vacuna para uso humano.

Debido a que el VNO puede transmitirse a través de las especies, existe una necesidad urgente de desarrollar estrategias de prevención para los seres humanos. Un enfoque racional consistiría en otorgar una inmunidad a largo plazo en grandes grupos de personas, y en reforzar esta inmunidad en caso de brotes de VNO. La vacuna contra el virus del sarampión (VP) se puede utilizar actualmente como vector para inmunizar contra enfermedades víricas heterólogas, lo que ofrece una novedosa y atractiva estrategia de vacunación contra el VNO. Recientemente se ha probado este vector contra la infección por VIH (6). La vacuna contra el VP, un virus vivo atenuado con ARN, es una de las vacunas humanas más segura y más eficaz desarrollada hasta ahora. Provoca una inmunidad muy eficaz, de larga duración después de una sola o dos inyecciones (7, 8). El genoma del VP es muy estable y nunca se ha observado reversión de las cepas de la vacuna a la patogenicidad. La cepa Schwarz del VP se utiliza en dos vacunas contra el sarampión ampliamente utilizadas, Attenuavax (Merck and Co. Inc., West Point, EE.UU.) y Rouvax (Aventis Pasteur, Marcy l'Etoile, Francia), y en las vacunas mixtas triple víricas (MMR) (9). Recientemente se ha generado un ADNc infeccioso de esta cepa (10) y se introdujeron unidades de transcripción adicionales (UTA) en éste para la clonación de genes extraños, basado en el trabajo de Radecke *et al.* (11). La vacuna rescatada del clon molecular era tan inmunógena como la vacuna parental en primates y ratones sensibles a la infección por VP. Por lo tanto, esta vacuna contra el VP aprobada y ampliamente utilizada se puede utilizar como vector para inmunizar individuos simultáneamente contra el sarampión y otras enfermedades infecciosas.

El VNO es un virus de ARN monocatenario de la familia Flaviviridae, género Flavivirus, dentro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa (2, 3). El virión está compuesto por tres proteínas estructurales, denominadas C (proteína del núcleo), M (proteína de la membrana) y E (proteína de la envoltura). La proteína E, que está expuesta en la superficie del virión, es responsable de la fijación del virus y de la fusión de la membrana específica para el virus. Debido a que la glucoproteína E puede servir potencialmente como inmunógeno protector principal de una vacuna VNO (12), los inventores introdujeron el ADNc del VNO que codifica la glucoproteína E truncada en el terminal carboxilo que carece de la región transmembrana de anclaje (restos E-1 a E-441, denominados en lo sucesivo sE_{WNV}) de la cepa IS-98-ST1 (13) en el ADNc infeccioso de la vacuna VP Schwarz (10) (Fig. 8A). La cepa IS-98-ST1 del VNO tiene las mismas propiedades neuropatológicas que la nueva variante denominada Isr98/NY99 que ha sido responsable de los brotes recientes del VNO en América del Norte y Oriente Medio (13). La secuencia del VNO se introdujo en una UTA situada entre los genes de la fosfoproteína (P) y matriz (M) en el genoma del VP. El virus VP_{Schw}-sE_{WNV} recombinante se produjo después de la transfección del plásmido correspondiente en linfocitos T colaboradores humanos que permite el rescate de paramixovirus de ARN de cadena negativa (11), después de la propagación en cultivos de células Vero. El crecimiento de VP_{Schw}-sE_{WNV} en células Vero estaba sólo ligeramente retrasado en comparación con el de Schwarz VP normal (VP_{Schw}) (Fig. 8B). Después de 60 h de infección, el rendimiento de VP_{Schw}-sE_{WNV} era comparable al de VP_{Schw}. La expresión de sE_{WNV} en células Vero infectadas con VP_{Schw}-sE_{WNV} se demostró por ensayos de inmunofluorescencia y radioinmunoprecipitación (RIP) (Fig. 8C, D). A las 40 h después de la infección, la superficie celular de los sincitios inducidos por VP_{Schw}-sE_{WNV} era claramente visualizado por el antisuero contra el VNO, lo que indica que sE_{WNV} se transporta a lo largo de los compartimentos de la ruta secretora (Fig. 8C). El análisis RIP puso de manifiesto que los anticuerpos contra el VNO reconocieron que sE_{WNV} migraba más rápido que la glucoproteína E auténtica (Fig. 8D). Curiosamente, se detectó sE_{WNV} en los sobrenadantes de células Vero infectadas con VP_{Schw}-sE_{WNV} a las 40 h después de la infección (Fig. 8D, panel Sobrenadantes / VP_{Schw}-sE_{WNV}, banda α -VNO). Así pues, VP_{Schw}-sE_{WNV} expresa una glucoproteína E recombinante que se segrega de manera eficiente. Las inmunotransferencias confirmaron que sE_{WNV} acumulado en el medio de cultivo de células Vero infectadas con VP_{Schw}-sE_{WNV} (datos no mostrados).

Ratones modificados genéticamente que expresan el receptor humano CD46 del VP y que carecen de receptor del interferón α/β (6, 14) (CD46^{+/-} IFN- α/β R^{-/-}, abreviado CD46-IFNAR) que son sensibles a la VP (14) se utilizaron para evaluar la respuesta inmunitaria inducida por VP_{Schw}-sE_{WNV}. Estos ratones carentes de respuesta de IFN- α/β aumentan las respuestas inmunitarias celulares y humorales similares a las de los ratones idóneos (6, 10, 15, 16). A dos grupos de seis ratones CD46-IFNAR se les inoculó por vía intraperitoneal (ip), con 10⁴ o 10⁶ dosis infecciosas de cultivo tisular (TCID₅₀) de VP_{Schw}-sE_{WNV}. A cada grupo se le administró dosis de refuerzo utilizando la misma dosis 1 mes después de la primera inmunización. Como referencia, los ratones CD46-IFNAR se inmunizaron con 10⁶ TCID₅₀ de VP_{Schw} "vacío". Un mes después de la primera inmunización, se detectaron anticuerpos anti-VP específicos en los antisueros de ratones inoculados con VP_{Schw} o VP_{Schw}-sE_{WNV} (Tabla 1). Los ratones que recibieron cualquiera de las dosis de VP_{Schw}-sE_{WNV} presentaban anticuerpos específicos contra el VNO en una dilución de 1:3000. Un mes después del refuerzo, los valores de anticuerpos contra el VNO habían alcanzado 1:30.000 a 1:200.000 (Tabla 1) y eran muy reactivos con la glucoproteína E del VNO (Fig. 9). No se detectaron anticuerpos contra el VNO en los sueros de los ratones de referencia (Tabla 1 y Fig. 9.). Estos resultados demuestran que una inyección de VP_{Schw}-sE_{WNV} produce anticuerpos contra el VNO, y que el refuerzo un mes después de la sensibilización aumenta sus valores de 10 a 60 veces.

Se midió la actividad neutralizante contra el VNO en antisueros con VP_{Schw}-sE_{WNV} utilizando un ensayo de reducción del foco (FRNT₉₀) (Tabla 1). Como referencia positiva, el antisuero con VNO de BALB/c inmunizados-MBT ratones congénicos (13) dio un título FRNT₉₀ de 50. El antisuero de los ratones CD46-IFNAR inoculados con VP_{Schw} "vacío" no tenía actividad neutralizante detectable. Ratones CD46-IFNAR inmunizados que recibieron 10⁴ ó 10⁶ TCID₅₀ de VP_{Schw}-sE_{WNV} aumentaron los anticuerpos neutralizantes con valores similares de FRNT₉₀ y las dosis de refuerzo aumentaron sus valores de 10 a 200-300. Estos datos demuestran que los ratones inoculados dos veces con la VP recombinante viva atenuada que codifica la forma segregada de la glucoproteína E de IS-98-ST1 tenían niveles elevados de anticuerpos contra el VNO con actividad neutralizante, independientemente de la dosis inyectada.

Debido a que la inmunidad mediada por anticuerpos puede ser crítica para proteger contra la infección por VNO (17, 18), los inventores examinaron si la transferencia pasiva de sueros de ratones inmunizados con VP_{Schw}-sE_{WNV} puede proteger a ratones BALB/c adultos de la infección por VNO (Tabla 2). Grupos de seis ratones BALB/c de 6 semanas recibieron por vía ip diversas cantidades de antisueros mezclados de ratones CD46-IFNAR inmunizados con VP_{Schw}-sE_{WNV} extraídos un mes después de la sensibilización o el refuerzo. Un día después, los ratones se sometieron a la prueba de provocación con 10 veces el 50% de la dosis letal (LD₅₀) por vía ip de la cepa ES-98-ST1 del VNO (13, 19). Como referencia positiva, los ratones BALB/c que recibieron como mucho 2 µl de antisuero con VNO se protegieron de la prueba de provocación (Tabla 2). Por el contrario, todos los ratones que recibieron 2 µl de suero no inmune de ratón o de suero de ratones inmunizados con VP_{Schw} "vacío" murieron en 11 a 12 días. Se observó inmunidad pasiva protectora en todos los ratones BALB/c después de la transferencia de 2 µl de mezcla de sueros de ratones CD46-IFNAR inmunizados una vez con 10⁶ TCID₅₀ de VP_{Schw}-sE_{WNV}. Tan poco como 1 µl de este antisuero produjo 66% de protección. La transferencia pasiva de los sueros extraídos un mes después de una sola inmunización con 10⁴ TCID₅₀ produjo una tasa de supervivencia del 50%. Sorprendentemente, la administración de 1 µl de antisueros con VP_{Schw}-sE_{WNV} extraídos 1 mes después de la protección al 100% inducida por dosis de refuerzo. Estos resultados indican que una sola inyección de 10⁶ TCID₅₀ o dos inyecciones de 10⁴ TCID₅₀ de VP_{Schw}-sE_{WNV} provocó una respuesta humoral protectora. Debido a que la cantidad de flavivirus inoculados durante la alimentación de los mosquito es probablemente del orden de 10² a 10⁴ de partículas de virus infecciosas (1), se evaluó la capacidad de los antisueros con VP_{Schw}-sE_{WNV} para proteger contra una gama de 10² a 10⁵ unidades formadoras de foco (FFU) de la cepa IS-98-ST1 del VNO. Grupos de seis ratones BALB/c se inmunizaron pasivamente con 2 µl de antisueros mezclados extraídos de ratones CD46-IFNAR inoculados dos veces con 10⁴ TCID₅₀ de VP_{Schw}-sE_{WNV} (Tabla 2). Se observaron tasas de supervivencia de 85-100% en ratones que habían recibido el antisuero con VP_{Schw}-sE_{WNV}, independientemente de las dosis letales de IS-98-ST1 (10 a 10.000 ip LD₅₀). Estos datos son coherentes con el hallazgo de que la respuesta humoral desempeña un papel fundamental en la protección contra la infección por VNO.

Los ratones que son completamente resistentes al tratamiento con IFN-α/β son altamente sensibles a los flavivirus encefalíticos (19, 20). En efecto, los inventores demostraron previamente que la infección por VNO de ratones CD46-IFNAR fue letal a los 3 días en lugar de 11 días en ratones idóneos (19). Para evaluar si la inmunidad inducida por VP_{Schw}-sE_{WNV} podría proteger a estos animales en peligro de infección por el VNO, tres ratones CD46-IFNAR del grupo que había recibido dos inyecciones de VP_{Schw}-sE_{WNV} (10⁶ TCID₅₀), se inocularon por vía ip con 100 FFU de IS-98-ST1 un mes después de las dosis de refuerzo. Los ratones inoculados con VP_{Schw} "vacío" se utilizaron como referencias. Los ratones que habían recibido VP_{Schw}-sE_{WNV} sobrevivieron a la prueba de provocación con VNO mientras que los ratones de referencia murieron a los 3 días. Se extrajo sangre a los ratones inmunizados con VP_{Schw}-sE_{WNV} 3 semanas después de la prueba de provocación. La respuesta a los anticuerpos FRNT₉₀ (valor ~ 100) era comparable a la respuesta previa a la prueba de provocación. En particular, los antisueros después de la prueba de provocación no reaccionan con las proteínas no estructurales del VNO tales como NS3 y NS5, como se muestra por el ensayo RIP (Fig. 9, panel VP_{Schw}-sE_{WNV}, banda 10⁶ TCID₅₀, día 20, pc), lo que sugiere que no se produjo ninguna replicación vírica después del prueba de provocación con el VNO. Estos datos demuestran que la inmunización con VP_{Schw}-sE_{WNV} previno la infección con VNO en animales muy sensibles.

El presente ejemplo muestra por primera vez que un vector de sarampión de virus vivos atenuados procedente de la vacuna VP Schwarz puede producir una inmunidad protectora contra un patógeno letal heterólogo. Estos datos constituyen también la prueba de concepto de que una vacuna Schwarz contra el sarampión con virus vivos atenuados modificada genéticamente para expresar la forma segregada de la glucoproteína E del VNO puede utilizarse como vacuna para prevenir la enfermedad del Nilo occidental en personas. El vector de vacuna de VP ofrece varias ventajas sobre otros vectores víricos existentes. La vacuna VP de Schwarz se ha utilizado en miles de millones de personas desde los años sesenta y ha demostrado ser segura y eficaz. Se produce fácilmente a gran escala en la mayoría de los países y puede distribuirse a bajo coste. El genoma de VP es muy estable y nunca se ha observado la reversión a la patogenicidad (8). Además, la VP se replica exclusivamente en el citoplasma, descartando la posibilidad de integración en el ADN del hospedador. Se ha demostrado que el vector de VP expresa varios genes, o combinaciones de genes, de gran tamaño durante más de doce atenuaciones (6, 16, 21, 22, 23, 24). Esta estabilidad se debe probablemente al hecho de que hay pocas restricciones sobre el tamaño del genoma para los virus pleomórficos con una nucleocápside helicoidal. A diferencia de los vectores víricos híbridos, el vector de VP recombinante es una VP auténtica que expresa un gen adicional. Esto reduce enormemente el riesgo de cambiar el tropismo y la patogenicidad de la vacuna original. Reduce también el riesgo de recombinación.

La vacuna recombinante contra VP-VNO según una forma de realización preferida de la presente invención es un prometedor vector vivo atenuado para inmunizar multitud de niños y adolescentes tanto contra las enfermedades de sarampión como del Nilo occidental. Aunque la existencia de una inmunidad contra la VP en casi toda la población adulta humana parece restringir su utilización a los lactantes, objetivo ya meritorio, estudios recientes demostraron que la revacunación ya de niños inmunizados produce un aumento de los anticuerpos contra la VP (25, 26). Estos y otros estudios (Ann Arvin) demostraron que la presencia de pre-inmunidad pasiva de la VP (anticuerpos maternos) no elude la replicación de la VP atenuada después de una segunda inyección. Esto abre la posibilidad de utilizar el vector derivado de VP con virus vivos atenuados para inmunizar a los adultos. En efecto, los inventores informaron que un virus VP-VIH recombinante produjo anticuerpos anti-VIH neutralizantes en ratones y macacos, incluso en presencia de inmunidad anti-VP preexistente (6). Debido a la transmisión entre especies, se teme que el VNO se convierte en una zoonosis recurrente con repetidos brotes estacionales en los seres humanos. Los inventores proponen que VP_{Schw-sE_{WNV}} podría utilizarse para provocar inmunidad de la memoria a largo plazo en grupos grandes de niños y adultos, y para aumentar esta inmunidad en caso de brote de enfermedad del Nilo occidental.

Bibliografía

1. D. W. C. Beasley, et al., Virology 309,190-5 (2003).
2. M. A. Brinton, Annu. Rev. Microbiol 56, 371-402 (2002).
3. L R. Petersen, A. A. Marfin, D. J. Gubler, JAMA 290, 524-28 (2003).
4. T. Monath, Ann.N.Y.Acad.Sci 951, 1-12 (2001).
5. T. P. Monath, J. Arroyo, F. Guirakhoo, Curr.Drug Targets Infect Disord 1, 37-50 (2001).
6. C. Lorin, et al., Journal of Virology 78, in press (2004).
7. D. Griffin, in Field's Virology, 4th Edition D. Knipe, P. Howley, Eds. (Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 2001), vol. 2, pp. 1401-1441.
8. M. Hilleman, Vaccine 20, 651-665 (2002).
9. E. Buynak, R. Weibel, W. J. JE, J. Stokes Jr, M. Hilleman, J. Am. Med. Assoc. 207, 2259-2262 (1969).
10. C. Combredet, et al., Journal of Virology 77, 11546-11554 (2003).
11. F. Radecke, et al., Embo J 14, 5773-84. (1995).
12. T. Wang, et al., J.Immunol. 167, 5273-5277 (2001).
13. T. Mashimo, et al., Proc.Natl.Acad. Sci.USA 99, 11311-11316 (2002).
14. B. Mrkic, et al., J Virol 72, 7420-7 (1998).
15. U. Muller, et al., Science 264, 1918-21. (1994).
16. M. Singh, R. Cattaneo, M. A. Billeter, J Virol 73, 4823-8. (1999).
17. M. S. Diamond, B. Shrestha, A. Marri, D. Mahan, M. Engle, J.Virol. 77, 2578-2586 (2003).
18. M. Haley, A. S. Retter, D. Fowler, J. Gea-Banacloche, N. P. O'Grady, Clin. Infect. Dis. 37, 88-90 (2003).
19. M. Lucas, et al., Immun. Cell Biol. 81, 230-236 (2003).
20. M. Lobigs, A. Müllbacher, Y. Wang, M. Pavy, E. Lee, J.Gen.Virol. 84, 567-572 (2003).
21. F. Radecke, M. Billeter, Reviews in Medical Virology 7, 49-63 (1997).
22. P. Spielhofer, et al., J. Virol. 72, 2150-2159 (1998).
23. M. Singh, M. Billeter, J. Gen. Virol. 80, 101-6 (1999).
24. Z. Wang, et al., Vaccine 19, 2329-2336 (2001).
25. A. Dilraj, et al., Lancet 355, 798-803 (2000).
26. A. Dilraj, et al., Pediatr. Infect Dis. J. 19, 1211-3. (2000).
27. P. Desprès, M.-P. Frenkiel, V. Deubel, Virology 196, 209-219 (1993).
28. P. Calain, L. Roux, J Virol 67, 4822-30 (1993).
29. H. Schneider, K. Kaelin, M. A. Billeter, Virology 227, 314-22. (1997).
30. C. L. Parks, R. A. Lerch, P. Walpita, M. S. Sidhu, S. A. Udem, J Virol 73, 3560-6 (1999).
31. P. Desprès, J. W. Griffin, D. E. Griffin. J.Virol. 69, 7345-7348 (1995).
32. Enders, J. F. & Peebles, T. C. (1954) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 277-286.
33. Schwarz, A. (1962) Am. J. Dis. Child. 103, 216-219.
34. Parks, C. L., Lerch, R. A., Walpita, P., Wang, H. P., Sidhu, M. S. & Udem, S. A. (2001) J Virol 75, 910-20.
35. Parks, C. L., Lerch, R. A., Walpita, P., Wang, H. P., Sidhu, M. S. &

TABLA 1. Respuesta de anticuerpos de ratones CD46-IFNAR a la inoculación intraperitoneal de VP_{Schw}-SE_{WNV}

Virus inmunizante	Valor de Ab específico para VP ⁴	Valor de Ab específico para WN ⁴	FRNT ₉₀ específico para WN ⁵
VNO ¹ (10 ³ FFU)	Nucleótido	10.000	50
VP _{Schw} ² (10 ⁶ TCID ₅₀)	30.000	<10	<10
VP _{Schw} -SE _{WNV} ² (10 ⁴ TCID ₅₀)	15.000	3.000	10
VP _{Schw} -SE _{WNV} ² (10 ⁶ TCID ₅₀)	25.000	3.000	10
2xVP _{Schw} -SE _{WNV} ³ (10 ⁴ TCID ₅₀)	90.000	30.000	200
2xVP _{Schw} -SE _{WNV} ³ (10 ⁶ TCID ₅₀)	140.000	200.000	300

¹Ratones BALB/c-MBT congénicos se inocularon por vía i.p. con la cepa IS-98-ST1 del VNO.

²El virus se administró por vía i.p. a ratones CD46-IFNAR.

³El virus se administró por vía i.p. dos veces a intervalos de 1 mes.

⁴Determinado por ELISA en sueros mezclados inactivados térmicamente.

⁵La mayor dilución en el suero que redujo el número de FFU de la VNO por lo menos en el 90%. NT: no determinado

TABLA 2. Capacidad protectora del antisuero con VP_{Schw}-SE_{WNV}

Material utilizado para inmunización	Volumen de sueros transferidos ¹ (μl)	VNO ² (FFU)	Protección (nº supervivientes/nº probado)	M.D.O.D. ³ (días ± S.D.)
Referencias	10	100	0/6	11,5 ± 1,5
DPBS	10	100	6/6	-
VNO ⁴	2	100	5/6	20
VP _{Schw} ⁵	2	100	0/6	12,0 ± 1,5
VP_{Schw}-SE_{WNV}⁶				
10 ⁶ TCID ₅₀ (día 30)	2	100	6/6	-
10 ⁴ TCID ₅₀ (día 30)	1	100	4/6	11,0 ± 1,5
10 ⁴ TCID ₅₀ (día 60)	10	100	3/6	10,5 ± 2,0
	1	100	6/6	-
	2	100	5/6	11
	2	1.000	6/6	-
	2	10.000	5/6	10
	2	100.000	5/6	11

¹Los ratones BALB/c recibieron 0,1 ml de DPBS que contenía la cantidad indicada de mezcla de sueros.

²Los ratones se sometieron a la prueba de provocación con la cepa IS-98-ST1 del VNO un día después de la transferencia pasiva.

³Día medio de muerte ± desviación estándar.

⁴Antisueros procedentes de ratones BALB/c-MBT congénicos resistentes (13) inoculados con 10³ FFU de IS-98-ST1 del VNO.

⁵Antisueros procedentes de ratones CD46-IFNAR se recogieron 30 días después de la inoculación de VP_{Schw} (10⁶ TCID₅₀).

⁶Antisueros procedentes de ratones CD46-IFNAR se recogieron 30 días después de 1 inyección o 60 días después de 2 inyecciones de VP_{Schw}-SE_{WNV}.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut Pasteur
CRNS

5 <120> NUEVAS PROTEÍNAS DE LOS VIRUS DEL DENGUE Y DEL NILO OCCIDENTAL Y GENES QUE CODIFICAN LAS ANTERIORES, Y SU UTILIZACIÓN EN APLICACIONES DE VACUNAS, TERAPÉUTICAS Y DE DIAGNÓSTICO

<130> 000466-0053

10 <140>
<141>

<150> CA 2.432.738
<151> 2003-06-20

15 <150> CA 2.420.092
<151> 2003-02-26

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

20 <210> 1
<211> 1380
<212> ADN
<213> Virus del Nilo occidental

<400> 1

atgagagttg	tgtttgtcgt	gctattgctt	ttgggtggccc	cagcttacag	cttcaactgc	60
cttggaatga	gcaacagaga	cttcttgga	ggagtgtctg	gagcaacatg	ggtggatttg	120
gttctcgaag	gcgacagctg	cgtgactatc	atgtctaagg	acaagcctac	catcgatgtg	180
aagatgatga	atatggaggc	ggtcaacctg	gcagagggtcc	gcagttattg	ctatttggct	240
accgtcagcg	atctctccac	caaagctgcg	tgcccgacca	tgggagaagc	tcacaatgac	300
aaacgtgctg	accagccttt	tgtgtgcaga	caaggagtgg	tggacagggg	ctggggcaac	360
ggctgcggtg	tatttggcaa	aggaagcatt	gacacatgcg	ccaaatttgc	ctgctctacc	420
aaggcaatag	gaagaacctat	cttgaaagag	aatatcaagt	acgaagtggc	catttttgtc	480
catggaccaa	ctactgtgga	gtcgcaagg	aactactcca	cacaggttgg	agccactcag	540
gcaggagatg	tcagcatcac	tcctgcggcg	ccttcataca	cactaaagct	tggagaatat	600
ggagagggtg	cagtggactg	tgaaccacgg	tcagggattg	acaccaatgc	atactacgtg	660
atgactgttg	gaacaaagac	gttcttggtc	catcgtgagt	ggttcattga	cctcaacctc	720
ccttggagca	gtgctggaag	tactgtgtgg	aggaacagag	agacgttaat	ggagtttgag	780
gaaccacacg	ccacgaagca	gtctgtgata	gcattgggct	cacaagaggg	agctctgcat	840
caagccttgg	ctggagccat	tcctgtggaa	ttttcaagca	acactgtcaa	gttgacgtcg	900
ggtcatttga	agtgtagagt	gaagatggaa	aaattgcagt	tgaagggaac	aacctatggc	960
gtctgttcaa	aggctttcaa	gtttcttggg	actcccgag	acacaggtca	cggcactgtg	1020
gtgttggatg	tgcatgtcac	tggcacggat	ggaccttgca	aagttcctat	ctcgtcagtg	1080
gcttcattga	acgacctaac	gccagtgggc	agatttggtc	ctgtcaaccc	ttttgtttca	1140
gtggccacgg	ccaacgctaa	ggtcctgatt	gaattggaac	caccttttgg	agactcatac	1200
atagtgttgg	gcagaggaga	acaacagatc	aatcaccatt	ggcacaagtc	tggagcagc	1260
attggcaaaag	cctttacaac	cacctcaaaa	ggagcgcaga	gactagccgc	tctaggagac	1320
acagcttggg	actttggatc	agttggaggg	gtgttcacct	cagttgggaa	ggctgtctaa	1380

25 <210> 2
<211> 2076
<212> ADN
<213> Virus del Nilo occidental

<400> 2

atgcaaaaga	aaagaggagg	aaagaccgga	attgcagtc	tgattggcct	gatcgccagc	60
gtaggagcag	ttaccctctc	taacttccaa	gggaaggtga	tgatgacggg	aaatgtctact	120

gacgtcacag	atgtcatcac	gattccaaca	gctgctggaa	agaacctatg	cattgtcaga	180
gcaatggatg	tgggatacat	gtgcgatgat	actatcactt	atgaatgccc	agtgtgtctg	240
gctggtaatg	atccagaaga	catcgactgt	tgggtcacaa	agtcagcagt	ctacgtcagg	300
tatggaagat	gcaccaagac	acgccactca	agacgcagtc	ggaggtcact	gacagtgcag	360
acacacggag	aaagcactct	agcgaacaag	aagggggctt	ggatggacag	caccaaggcc	420
acaaggattt	tggtaaaaaa	agaatcatgg	atcttgaggga	accctggata	tgccctggtg	480
gcagccgtca	ttggttggat	gcttgggagc	aacaccatgc	agagagttgt	gtttgtcgtg	540
ctattgcttt	tgggtggccc	agcttacagc	ttcaactgcc	ttggaatgag	caacagagac	600
ttcttgggaag	gagtggtctg	agcaacatgg	gtggatttgg	ttctcgaagg	cgacagctgc	660
gtgactatca	tgtctaagga	caagcctacc	atcgatgtga	agatgatgaa	tatggaggcg	720
gtcaaccttg	cagaggtccg	cagttattgc	tatttggcta	ccgtcagcga	tctctccacc	780
aaagctgcgt	gcccagccat	gggagaagct	cacaatgaca	aacgtgctga	cccagctttt	840
gtgtgcagac	aaggcgtggt	ggacaggggc	gctgcggatt	atctggcaaa	900	
ggaagcattg	acacatgcgc	caaatttgcc	tgctctacca	aggcaatagg	aagaaccatc	960
ttgaaagaga	atatcaagta	cgaagtggcc	atttttgtcc	atggaccaac	tactgtggag	1020
tgcacggaa	actactccac	acaggttggg	gccactcagg	cagggagatt	cagcatcact	1080
cctgtgcgag	cttcatacac	actaaagctt	ggagaatatg	gagaggtagc	agtggactgt	1140
gaaccacggt	cagggattga	caccaatgca	tactacgtga	tgactggttg	aacaaagacg	1200
ttcttgggtc	atcgtgagtg	gttcatggac	ctcaacctcc	cttggagcag	tgctggaagt	1260
actgtgtgga	ggaacagaga	gacgttaatg	gagtttgagg	aaccaacagc	cacgaagcag	1320
tctgtgatat	cattgggctc	acaagaggga	gctctgcac	aagctttggc	tggagccatt	1380
cctgtggaat	tttcaagcaa	cactgtcaag	ttgacgtcgg	gtcatttgaa	gtgtagagtg	1440
aagatggaaa	aattgcagtt	gaagggaaca	acctatggcg	tctgttcaaa	ggctttcaag	1500
tttcttggga	ctcccgacga	cacaggtcac	ggcactgtgg	tggtggaatt	gcagtacact	1560
ggcacggatg	gaccttgcaa	agttcctatc	tcgtcagttg	cttcattgaa	cgacctaacg	1620
ccagtgggca	gatttggtcac	tgtcaaccct	tttgtttcag	tggccacggc	caacgctaag	1680
gtcctgattg	aattggaacc	accctttgga	gactcataca	tagtggtggg	cagaggagaa	1740
caacagatca	atcaccattg	gcacaagtct	ggaagcagca	ttggcaaaag	ctttacaacc	1800
accctcaaa	gagcgcagag	actagccgct	ctagagagaca	cagcttggga	ctttggatca	1860
gttgaggagg	tgttcacctc	agttgggaag	gctgtccatc	aagtgttcgg	aggagcattc	1920
cgctcactgt	tggaggcatt	gtcctggata	acgcaaggat	tgctgggggc	tctcctgttg	1980
tggatgggca	tcaatgctcg	tgataggtcc	atagetctca	cgtttctcgc	agttggaggga	2040
gttctgtctc	tcctctccgt	gaacgtgcac	gcttaa			2076

<210> 3

<211> 1110

<212> ADN

5 <213> Virus del Nilo occidental

<400> 3

atgaggtcca	tagctctcac	gtttctcgca	gttgaggag	ttctgctctt	cctctccgtg	60
aacgtgcacg	ctgacactgg	gtgtgccata	gacatcagcc	ggcaagagct	gagatgtgga	120
agtggagtgt	tcatacacaa	tgatgtggag	gcttggatgg	accggtacaa	gtattaccct	180
gaaacgccac	aaggcctagc	caagatcatt	cagaaagctc	ataaggaagg	agtgtgcggt	240
ctacgatcag	tttccagact	ggagcatcaa	atgtgggaag	cagtgaaggga	cgagctgaac	300
actcttttga	aggagaatgg	tgtggacctt	agtgtcgtgg	ttgagaaaca	ggagggaatg	360
tacaagtccg	cacctaaacg	cctcaccgcc	accacggaaa	aattggaaat	tggctggaag	420
gcctggggaa	agagtatttt	atttgcacca	gaactcgcca	acaacacctt	tgtggttgat	480
gggtccggaga	ccaaggaatg	tccgactcag	aatcgcgctt	ggaatagctt	agaagtggag	540
gattttggat	ttggtctcac	cagcactcgg	atgttctcga	aggtcagaga	gagcaacaca	600
actgaatgtg	actcgaagat	cattggaacg	gctgtcaaga	acaacttggc	gatccacagt	660
gacctgtcct	attggattga	aagcaggctc	aatgatacgt	ggaagcttga	aagggcagtt	720
ctgggtgaag	tcaaatcatg	tacgtggcct	gagacgcata	ccttgtgggg	cgatggaatc	780
cttgagagtg	acttgataat	accagtcaca	ctggcggggc	cacgaagcaa	tcacaatcgg	840
agacctgggt	acaagacaca	aaaccagggc	ccatgggacg	aaggccgggt	agagattgac	900
ttcgattact	gccaggaac	tacggtcacc	ctgagtgaga	gctgaggaca	ccgtggacct	960
gccactcgca	ccaccacaga	gagcggaaag	ttgataacag	attggtgctg	caggagctgc	1020
accttaaccac	cactgcgcta	ccaaactgac	agcggctgtt	ggtatggtat	ggagatcaga	1080
ccacagagac	atgatgaaaa	gacctaataa				1110

<210> 4

10 <211> 2040

<212> ADN

<213> Virus del dengue tipo 1

<400> 4

```

atgaacagga ggaaaagatc cgtgaccatg ctctcatgc tgctgccac agtcctgggt 60
ttccatttga ccacacgagg gggagagcca cacatgatag ttagtaagca ggaaagagga 120
aagtcactct tgttcaagac ctctgcagggt gtcaatatgt gcactctcat tgcgatggat 180
ttgggagagt tatgtgagga cacaatgact tacaatgcc cccggatcac tgaggcggaa 240
ccagatgacg ttgactgctg gtgcaatgcc acagacacat gggtgacctg tgggacgtgt 300
tctcaaaccg gtgaacaccg acgagacaaa cgttccgtgg cactggcccc acacgtggga 360
cttggtctag aaacaagaac cgaaacatgg atgtcctctg aaggcgccctg gaaacaaata 420
caaaaagtgg agacttgggc tttgagacac ccaggattca cggtgatagc tcttttttta 480
gcacatgcca taggaacatc catcactcag aaagggatca ttttcattct gctgatgctg 540
gtaacaccat caatggccat gcgatgcgtg ggaataggca acagagactt cgttgaagga 600
ctgtcaggag caacgtgggt ggacgtggta ttggagcatg gaagctgcgt caccaccatg 660
gcaaaaaata aaccaacatt ggacattgaa ctcttgaaga cggaggtcac gaacctgccc 720
gtcttgcgca aatttgcat tgaagctaaa atatcaaaaca ccaccaccga ttcaagatgt 780
ccaacacaag gagaggctac actggtggaa gaacaagacg cgaactttgt gtgtcgacga 840
acggttgtgg acagaggctg gggcaatggc tgcggactat ttggaaaagg aagcctactg 900
acgtgtgcta agttcaagtg tgtgacaaaa ctggaaggaa agatagttca atatgaaaac 960
ttaaaatatt cagtgatagt cactgtccac acagggggacc agcaccaggt gggaaacgag 1020
actacagaac atggaacaat tgcaaccata acacctcaag ctctacgctc ggaaatacag 1080
ttgacagact acggaaccct tacactggac tgcacacca gaacagggtt ggactttaat 1140
gaggtggtgc tattgacaat gaaagaaaaa tcatggcttg tccacaaaca atggtttcta 1200
gacttaccac tgccttggac ttcgggggct tcaacatccc aagagacttg gaacagacaa 1260
gatttgcgtg tcacattcaa gacagctcat gcaaagaagc aggaagtagt cgtactggga 1320
tcacaggaag gagcaatgca cactgcgttg accggggcga cagaaatcca gacgtcagga 1380
acgacaacaa tctttgcagg acacctgaaa tgcagattaa aaatggataa actgacttta 1440
aaagggatgt catatgtgat gtgcacaggc tcattttaagc tagagaagga agtggctgag 1500
acccagcatg gaactgtcct agtgcagggt aaatacgaag gaacagatgc gccatgcaag 1560
atcccccttt cgacccaaga tgagaaagga gtgaccacga atgggagatt gataacagcc 1620
aatcccatag ttactgacaa agaaaaacca atcaacattg agacagaacc accttttgggt 1680
gagagctaca tcatagtagg ggcagggtgaa aaagctttga aactaagctg gttcaagaaa 1740
ggaagcagca tagggaaaaa gttcgaagca atcgcccgag gagcacgaag gatggctatc 1800
ctgggagaca ccgcatggga ctctggctct ataggaggag tgtttacgct tgtgggaaaa 1860
ttggtacacc aggttttttg aaccgcatac ggggtcctgt tcagcggcgt ttcttggacc 1920
atgaaaaatg gaatagggat cttgctgaca tggttgggat taaattcaag gagcgcgtcg 1980
ctttcgatga cgtgcattgc agttggcatg gttacactgt acctaggagt catgggttaa 2040

```

<210> 5

<211> 459

<212> PRT

5 <213> Virus del Nilo occidental

<400> 5

```

Met Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala
      5                      10                      15

Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu
      20                      25                      30

Gly Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp
      35                      40                      45

Ser Cys Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val
      50                      55                      60

Lys Met Met Asn Met Glu Ala Val Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser
      65                      70                      75

Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala
      80                      85                      90

Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro

```

ES 2 394 307 T3

95					100					105				
Ala	Phe	Val	Cys	Arg	Gln	Gly	Val	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn
				110					115					120
Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Cys	Ala	Lys
				125					130					135
Phe	Ala	Cys	Ser	Thr	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Glu
				140					145					150
Asn	Ile	Lys	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Phe	Val	His	Gly	Pro	Thr	Thr
				155					160					165
Val	Glu	Ser	His	Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Gln	Val	Gly	Ala	Thr	Gln
				170					175					180
Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Ile	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Leu
				185					190					195
Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Glu	Val	Thr	Val	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg
				200					205					210
Ser	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Val	Met	Thr	Val	Gly	Thr
				215					220					225
Lys	Thr	Phe	Leu	Val	His	Arg	Glu	Trp	Phe	Met	Asp	Leu	Asn	Leu
				230					235					240
Pro	Trp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Trp	Arg	Asn	Arg	Glu	Thr
				245					250					255
Leu	Met	Glu	Phe	Glu	Glu	Pro	His	Ala	Thr	Lys	Gln	Ser	Val	Ile
				260					265					270
Ala	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Leu	His	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly
				275					280					285
Ala	Ile	Pro	Val	Glu	Phe	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Ser
				290					295					300
Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Val	Lys	Met	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Lys
				305					310					315
Gly	Thr	Thr	Tyr	Gly	Val	Cys	Ser	Lys	Ala	Phe	Lys	Phe	Leu	Gly
				320					325					330
Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Glu	Leu	Gln
				335					340					345
Tyr	Thr	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	Ile	Ser	Ser	Val
				350					355					360
Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Val
				365					370					375
Asn	Pro	Phe	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Ala	Asn	Ala	Lys	Val	Leu	Ile
				380					385					390
Glu	Leu	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Val	Gly	Arg
				395					400					405
Gly	Glu	Gln	Gln	Ile	Asn	His	His	Trp	His	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser
				410					415					420
Ile	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr	Thr	Thr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln	Arg	Leu
				425					430					435
Ala	Ala	Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Gly
				440					445					450
Val	Phe	Thr	Ser	Val	Gly	Lys	Ala	Val						
				455										

<210> 6
<211> 691

ES 2 394 307 T3

<212> PRT

<213> Virus del Nilo occidental

<400> 6

Met	Gln	Lys	Lys	Arg	Gly	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Ala	Val	Met	Ile	
				5					10					15	
Gly	Leu	Ile	Ala	Ser	Val	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Phe	Gln	
				20					25					30	
Gly	Lys	Val	Met	Met	Thr	Val	Asn	Ala	Thr	Asp	Val	Thr	Asp	Val	
				35					40					45	
Ile	Thr	Ile	Pro	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Asn	Leu	Cys	Ile	Val	Arg	
				50					55					60	
Ala	Met	Asp	Val	Gly	Tyr	Met	Cys	Asp	Asp	Thr	Ile	Thr	Tyr	Glu	
				65					70					75	
Cys	Pro	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Asn	Asp	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp	Cys	
				80					85					90	
Trp	Cys	Thr	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Val	Arg	Tyr	Gly	Arg	Cys	Thr	
				95					100					105	
Lys	Thr	Arg	His	Ser	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	
				110					115					120	
Thr	His	Gly	Glu	Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Lys	Lys	Gly	Ala	Trp	Met	
				125					130					135	
Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Thr	Glu	Ser	Trp	
				140					145					150	
Ile	Leu	Arg	Asn	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Ile	Gly	
				155					160					165	
Trp	Met	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Met	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Val	Val	
				170					175					180	
Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ser	Phe	Asn	Cys	Leu	Gly	
				185					190					195	
Met	Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Leu	Glu	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	
				200					205					210	
Val	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Thr	Ile	Met	Ser	
				215					220					225	
Lys	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Asp	Val	Lys	Met	Met	Asn	Met	Glu	Ala	
				230					235					240	

Val	Asn	Leu	Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Tyr	Cys	Tyr	Leu	Ala	Thr	Val	245	250	255
Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Lys	Ala	Ala	Cys	Pro	Thr	Met	Gly	Glu	Ala	260	265	270
His	Asn	Asp	Lys	Arg	Ala	Asp	Pro	Ala	Phe	Val	Cys	Arg	Gln	Gly	275	280	285
Val	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	290	295	300
Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Ala	Cys	Ser	Thr	Lys	Ala	305	310	315
Ile	Gly	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Glu	Asn	Ile	Lys	Tyr	Glu	Val	Ala	320	325	330
Ile	Phe	Val	His	Gly	Pro	Thr	Thr	Val	Glu	Ser	His	Gly	Asn	Tyr	335	340	345
Ser	Thr	Gln	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Ile	Thr	350	355	360
Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Glu	365	370	375
Val	Thr	Val	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Ala	380	385	390
Tyr	Tyr	Val	Met	Thr	Val	Gly	Thr	Lys	Thr	Phe	Leu	Val	His	Arg	395	400	405
Glu	Trp	Phe	Met	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro	Trp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	410	415	420
Thr	Val	Trp	Arg	Asn	Arg	Glu	Thr	Leu	Met	Glu	Phe	Glu	Glu	Pro	425	430	435
His	Ala	Thr	Lys	Gln	Ser	Val	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	440	445	450
Ala	Leu	His	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Pro	Val	Glu	Phe	Ser	455	460	465
Ser	Asn	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Val	470	475	480
Lys	Met	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Gly	Val	Cys	485	490	495
Ser	Lys	Ala	Phe	Lys	Phe	Leu	Gly	Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	His	500	505	510
Gly	Thr	Val	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Thr	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	515	520	525
Cys	Lys	Val	Pro	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Thr	530	535	540
Pro	Val	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Val	Asn	Pro	Phe	Val	Ser	Val	Ala	545	550	555
Thr	Ala	Asn	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Glu	Leu	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly			

	560		565		570
Asp Ser Tyr Ile	Val Val Gly Arg Gly	Glu Gln Gln Ile Asn His			
	575		580		585
His Trp His Lys	Ser Gly Ser Ser Ile	Gly Lys Ala Phe Thr Thr			
	590		595		600
Thr Leu Lys Gly	Ala Gln Arg Leu Ala	Ala Leu Gly Asp Thr Ala			
	605		610		615
Trp Asp Phe Gly	Ser Val Gly Gly Val	Phe Thr Ser Val Gly Lys			
	620		625		630
Ala Val His Gln	Val Phe Gly Gly Ala	Phe Arg Ser Leu Phe Gly			
	635		640		645
Gly Met Ser Trp	Ile Thr Gln Gly Leu	Leu Gly Ala Leu Leu Leu			
	650		655		660
Trp Met Gly Ile	Asn Ala Arg Asp Arg	Ser Ile Ala Leu Thr Phe			
	665		670		675
Leu Ala Val Gly	Gly Val Leu Leu Phe	Leu Ser Val Asn Val His			
	680		685		690

Ala

<210> 7

<211> 368

<212> PRT

5 <213> Virus del Nilo occidental

<400> 7

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

140	145	150
Glu Leu Ala Asn Asn Thr Phe Val Val	Asp Gly Pro Glu Thr Lys	
155	160	165
Glu Cys Pro Thr Gln Asn Arg Ala Trp	Asn Ser Leu Glu Val Glu	
170	175	180
Asp Phe Gly Phe Gly Leu Thr Ser Thr	Arg Met Phe Leu Lys Val	
185	190	195
Arg Glu Ser Asn Thr Thr Glu Cys Asp	Ser Lys Ile Ile Gly Thr	
200	205	210
Ala Val Lys Asn Asn Leu Ala Ile His	Ser Asp Leu Ser Tyr Trp	
215	220	225
Ile Glu Ser Arg Leu Asn Asp Thr Trp	Lys Leu Glu Arg Ala Val	
230	235	240
Leu Gly Glu Val Lys Ser Cys Thr Trp	Pro Glu Thr His Thr Leu	
245	250	255
Trp Gly Asp Gly Ile Leu Glu Ser Asp	Leu Ile Ile Pro Val Thr	
260	265	270
Leu Ala Gly Pro Arg Ser Asn His Asn	Arg Arg Pro Gly Tyr Lys	
275	280	285
Thr Gln Asn Gln Gly Pro Trp Asp Glu	Gly Arg Val Glu Ile Asp	
290	295	300
Phe Asp Tyr Cys Pro Gly Thr Thr Val	Thr Leu Ser Glu Ser Cys	
305	310	315
Gly His Arg Gly Pro Ala Thr Arg Thr	Thr Thr Glu Ser Gly Lys	
320	325	330
Leu Ile Thr Asp Trp Cys Cys Arg Ser	Cys Thr Leu Pro Pro Leu	
335	340	345
Arg Tyr Gln Thr Asp Ser Gly Cys Trp	Tyr Gly Met Glu Ile Arg	
350	355	360
Pro Gln Arg His Asp Glu Lys Thr		
365		

<210> 8

<211> 679

<212> PRT

5 <213> Virus del dengue tipo 1

<400> 8

Met Asn Arg Arg Lys Arg Ser Val Thr	Met Leu Leu Met Leu Leu
5	10 15
Pro Thr Val Leu Ala Phe His Leu Thr	Thr Arg Gly Gly Glu Pro
20	25 30
His Met Ile Val Ser Lys Gln Glu Arg	Gly Lys Ser Leu Leu Phe
35	40 45

ES 2 394 307 T3

Lys	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Asn	Met	Cys	Thr	Leu	Ile	Ala	Met	Asp	
				50					55					60	
Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Glu	Asp	Thr	Met	Thr	Tyr	Lys	Cys	Pro	Arg	
				65					70					75	
Ile	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Asp	Asp	Val	Asp	Cys	Trp	Cys	Asn	Ala	
				80					85					90	
Thr	Asp	Thr	Trp	Val	Thr	Tyr	Gly	Thr	Cys	Ser	Gln	Thr	Gly	Glu	
				95					100					105	
His	Arg	Arg	Asp	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Pro	His	Val	Gly	
				110					115					120	
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Thr	Glu	Thr	Trp	Met	Ser	Ser	Glu	Gly	
				125					130					135	
Ala	Trp	Lys	Gln	Ile	Gln	Lys	Val	Glu	Thr	Trp	Ala	Leu	Arg	His	
				140					145					150	
Pro	Gly	Phe	Thr	Val	Ile	Ala	Leu	Phe	Leu	Ala	His	Ala	Ile	Gly	
				155					160					165	
Thr	Ser	Ile	Thr	Gln	Lys	Gly	Ile	Ile	Phe	Ile	Leu	Leu	Met	Leu	
				170					175					180	
Val	Thr	Pro	Ser	Met	Ala	Met	Arg	Cys	Val	Gly	Ile	Gly	Asn	Arg	
				185					190					195	
Asp	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	Val	Asp	Val	Val	
				200					205					210	
Leu	Glu	His	Gly	Ser	Cys	Val	Thr	Thr	Met	Ala	Lys	Asn	Lys	Pro	
				215					220					225	
Thr	Leu	Asp	Ile	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr	Glu	Val	Thr	Asn	Pro	Ala	
				230					235					240	
Val	Leu	Arg	Lys	Leu	Cys	Ile	Glu	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Thr	Thr	
				245					250					255	
Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Glu	
				260					265					270	
Glu	Gln	Asp	Ala	Asn	Phe	Val	Cys	Arg	Arg	Thr	Val	Val	Asp	Arg	
				275					280					285	
Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Leu	
				290					295					300	
Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Lys	Cys	Val	Thr	Lys	Leu	Glu	Gly	Lys	Ile	
				305					310					315	
Val	Gln	Tyr	Glu	Asn	Leu	Lys	Tyr	Ser	Val	Ile	Val	Thr	Val	His	
				320					325					330	
Thr	Gly	Asp	Gln	His	Gln	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Thr	Glu	His	Gly	
				335					340					345	
Thr	Ile	Ala	Thr	Ile	Thr	Pro	Gln	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Ile	Gln	
				350					355					360	
Leu	Thr	Asp	Tyr	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Cys	Ser	Pro	Arg	Thr	
				365					370					375	

Gly	Leu	Asp	Phe	Asn	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Thr	Met	Lys	Glu	Lys	
				380					385					390	
Ser	Trp	Leu	Val	His	Lys	Gln	Trp	Phe	Leu	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	
				395					400					405	
Trp	Thr	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Ser	Gln	Glu	Thr	Trp	Asn	Arg	Gln	
				410					415					420	
Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Phe	Lys	Thr	Ala	His	Ala	Lys	Lys	Gln	Glu	
				425					430					435	
Val	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Met	His	Thr	Ala	Leu	
				440					445					450	
Thr	Gly	Ala	Thr	Glu	Ile	Gln	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Phe	
				455					460					465	
Ala	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Leu	Lys	Met	Asp	Lys	Leu	Thr	Leu	
				470					475					480	
Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Val	Met	Cys	Thr	Gly	Ser	Phe	Lys	Leu	Glu	
				485					490					495	
Lys	Glu	Val	Ala	Glu	Thr	Gln	His	Gly	Thr	Val	Leu	Val	Gln	Val	
				500					505					510	
Lys	Tyr	Glu	Gly	Thr	Asp	Ala	Pro	Cys	Lys	Ile	Pro	Phe	Ser	Thr	
				515					520					525	
Gln	Asp	Glu	Lys	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Thr	Ala	
				530					535					540	
Asn	Pro	Ile	Val	Thr	Asp	Lys	Glu	Lys	Pro	Ile	Asn	Ile	Glu	Thr	
				545					550					555	
Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Glu	Ser	Tyr	Ile	Ile	Val	Gly	Ala	Gly	Glu	
				560					565					570	
Lys	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	Trp	Phe	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	
				575					580					585	
Lys	Met	Phe	Glu	Ala	Ile	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Met	Ala	Ile	
				590					595					600	
Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Gly	Val	Phe	
				605					610					615	
Thr	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	Val	His	Gln	Val	Phe	Gly	Thr	Ala	Tyr	
				620					625					630	
Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Gly	Val	Ser	Trp	Thr	Met	Lys	Ile	Gly	Ile	
				635					640					645	
Gly	Ile	Leu	Leu	Thr	Trp	Leu	Gly	Leu	Asn	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	
				650					655					660	
Leu	Ser	Met	Thr	Cys	Ile	Ala	Val	Gly	Met	Val	Thr	Leu	Tyr	Leu	
				665					670					675	

Gly Val Met Val

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

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 9
 tatcgtacga tgagagttgt gttgtcgtg cta

	<210> 10 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 10 atagcgcgct tagacagcct tcccaactga	30
10	<210> 11 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
15	<400> 11 tatcgtacga tgcaaaagaa aagaggagga aag	33
20	<210> 12 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 12 atagcgcgct taagcgtgca cggtcacgga g	31
25	<210> 13 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 13 tatcgtacga tgaggtccat agctctcacg	30
35	<210> 14 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
40	<400> 14 atagcgcgct cattaggtct ttcatcatg tctc	34
	<210> 15 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 15

tatcgtacga tgaacaggag gaaaagatcc gtg

33

5

<210> 16

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 16

atagcgcgct taaaccatga ctctaggta cag

33

REIVINDICACIONES

1. Virus recombinante que es un virus vivo atenuado o defectuoso del sarampión, que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que es un virus del Nilo occidental o respectivamente un antígeno del virus del dengue que se selecciona en el grupo siguiente:
 - las glucoproteínas heterodímeras Prem-E o
 - una glucoproteína de la envoltura segregada sE o
 - un polipéptido que tiene al menos un 80% de homología, o un 85% de homología con el polipéptido que tiene la secuencia SEC. ID. nº 6, SEC. ID. nº 5 o SEC. ID. nº 8,siendo dicho virus recombinante capaz de expresar dicho polipéptido y siendo dicho polipéptido capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra un virus del Nilo occidental en un animal o, respectivamente, contra un virus del dengue en un animal.
2. Virus recombinante según la reivindicación 1, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido seleccionado en el grupo siguiente:
 - la glucoproteína heterodímero Prem-E que comprende la secuencia SEC. ID. nº 6 o SEC. ID. nº 8 o tiene la secuencia SEC. ID. nº 6 o SEC. ID. nº 8.
 - la proteína sE de la envoltura segregada que tiene la secuencia SEC. ID. nº 5.
3. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia SEC. ID. nº 2 o es la secuencia SEQ 10 nº 1 o que comprende la secuencia SEC. ID. nº 4.
4. Virus recombinante de sarampión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, en su genoma, dicho polinucleótido.
5. Virus recombinante de sarampión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que procede de la cepa Schwarz del virus del sarampión.
6. Composición farmacéutica, que comprende:
 - a) por lo menos un virus recombinante del sarampión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 - b) un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, capaz de inducir una inmunidad protectora contra un virus del Nilo occidental en un animal o, respectivamente, de inducir una inmunidad protectora contra el virus del dengue, en un animal.
8. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 7, como agente contra el virus del Nilo occidental o, respectivamente, un agente contra el virus del dengue, o para la preparación de una vacuna contra el virus del Nilo occidental o, respectivamente, una vacuna contra el virus del dengue.
9. Célula hospedadora, que comprende un virus recombinante tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Procedimiento de producción de un virus recombinante para la preparación de una vacuna contra el virus del Nilo occidental, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
 - a) proporcionar una célula hospedadora tal como se define en la reivindicación 9;
 - b) colocar la célula hospedadora de la etapa a) en condiciones que permitan la replicación de un virus recombinante tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es capaz de expresar dicho polipéptido, y
 - c) aislar el virus recombinante producido en la etapa b).
11. Célula hospedadora según la reivindicación 9, que es la estirpe celular depositada en la C.N.C.M. con el número de entrada I-3018.

12. Utilización de una cantidad eficaz de al menos un virus recombinante de sarampión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de una infección por el virus del Nilo occidental o una infección por el virus del dengue, en un animal.

Figura 1

atgagagtgtgttgcgtgctattgcttttggtggccccagcttacagcttcaactgccttgaatgagcaacagagactt
 ctggaaggagtgtctggagcaacatgggtggatttgggtctcgaaggcgacagctgcgtgactatcatgtctaaggac
 aagcctaccatcgatgtgaagatgatgaatatggaggcggtaaacctggcagaggtcgcgagttattgctatttggcta
 ccgtcagcgaftctccaccaagctgcgtgcccagcatgggagaagctcacaatgacaaacgtgctgaccagc
 tttgtgtgcagacaaggagtgtgtggacaggggtggggaacggctgcggattatttggcaaaggaagcattgaca
 catgcgcaaatgtcctgctctaccaaggcaataggaagaaccatctgaaagagaataicaagtacgaagtggcc
 attttgtccatggaccaactactgtggagtcgcacggaaactactccacaagggttgagccactcaggcagggag
 attcagcatcactcctgcggcgccctcatacacactaaagcttgagaatatggagaggtgacagtggaactgtgaacc
 acggtcagggattgacaccaatgcatactacgtgagtgttggaacaaagacgttcttggtccatcgtgagtgttca
 tggacctcaacctcccttgagcagtgctggaagtactgtgtggaggaacagagagacgttaattggatttgggaa
 ccacacgccacgaagcagtcgtgatagcattgggtcacaagagggagctctgcatcaagcttggctggagccatt
 cctgtggaattttcaagcaacactgtcaagttgacgtcgggtcattgaagtgtagagtgaagatggaaaaattgcagt
 gaagggaacaacctatggcgtctgtcaaaggcttcaagttcttgggactccgcagacacaggtcacggcactgt
 ggtgttgaattgcagtacactggcacggatggacctgcaaagttcctatctcgtcagtggttcatgaaacgaccta
 cgccagtgggcagattgttactgtcaaccttttgggtcagtggtccacggccaacgctaaggtcctgattgaattggaa
 ccacctttggagactacatagtggtgggcagaggagaacaacagatcaatcaccattggcacaagtctggaa
 gcagcattggcaaagcctttacaaccacctcaaaggagcgcagagactagccgctctaggagacacagcttggg
 actttggatcagttggaggggtgtcacctcagttgggaaggctgtctaa

Figura 2

MRVWFVLLLLLVAPAYSFNCLGMSNRDFLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIMSKDKP
 TIDVKMMNMEAVNLAEVRSYCYLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRAPAFVCRQ
 GVVDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFACSTKAIGRTILKENIKYEVAIFVHGPTTVES
 HGNYSTQVGATQAGRFSITPAAPSYTLKLGEYGEVTVDCPRSGIDTNAYYVMTVG
 TKTFVLVHREWFMDLNLPWSSAGSTVWRNRETLMEFEEPHATKQSVIALGSQEGAL
 HQALAGAIPVEFSSNTVKLTSGHLKCRVKMEKLQLKGTTYGVCSKAFKFLGTPADT
 GHGTVVLELQYTGTGDPCKVPISSVASLNDLTPVGRLVTVPFVSVATANAKVLIEL
 EPPFGDSYIVVGRGEQQINHHWHKSGSSIGKAFTTTLKGAQRLAALGDTAWDFGSV
 GGVTFSVGKAV

Figura 3

atgcaaaagaaaagaggaggaaagaccggaattgcagtcattggtgctgatcgccagcgtaggagcagttacc
 ctctctaactccaaggggaaggatgatgacggtaaattgctactgacgtcacagatgtcatcacgattccaacagctg
 ctggaagaacctaagcattgtcagagcaatggatgtgggatacatgtgcgatgatactatcacttatgaatgccagt
 gctgtcggctggtaatgatccagaagacatcgactgttgggtgcacaaagtcagcagctacgtcagglatggaagt
 caccaagacacgccacccaagacgcagtcggaggtcactgacagtgacagacacacggagaaagcactctagcg
 aacaagaagggggcttggatggacagcaccaaggccacaaggatttggtaaaaacagaatcatggatcttgagg
 aaccttggatagccctgggtggcagccgtcattggttggatgcttgggagcaacacccatgcagagagttgtgttgcgt
 gctattgcttttgggtggcccagcttacagcttcaactgccttggaaatgagcaacagagacttcttggaggaggtgtctgg
 agcaaatgggtggatttgggtctcgaaggcgacagctgcgtgactatcatgtctaaggacaagcclaccatcgatgtg
 aagatgatgaatatggaggcgttaacctggcagaggtccgcagttattgctatttggctaccgtcagcgaatctcca
 ccaaagctgctgcccagccatgggagaagctcacaatgacaaacgtgctgaccagcttctgtgtgcagacaagg
 agtgggtggacaggggtggggcaacggctgcggattatttggcaaaagggaagcattgacacatgcgccaaatttgcct
 gctctaccaaggcaataggaagaaccatcttgaagagagaatatcaagtacgaagtggccattttgtccatggacca
 ctactgtggagtcgcacggaaactactccacacaggttggagccaactcaggcagggagattcagcatcactctcgtg
 gggcctcctacacactaaagcttggagaatatggagaggtgacagtggtgactgtgaaccacgggtcagggattgacac
 caatgcatactacgtgatgactgttggaaacaagacgttcttgggtccatcgtgagtggttcatggacctcaacctccctt
 gagcagtgctggaagtactgtgtggagggaacagagagacgttaattggagtttgggaaccacacgccacgaagca
 gtctgtgatagcatttgggtcacaagagggagctctgcatcaagcttgggtggagccattcctgttgaattttcaagca
 aactgtcaagttgacgtcgggtcatttgaagtgtagagtgaagatggaaaaattgcagttgaagggaacaacctatg
 gcgtctgttcaaaggcttcaagtttcttgggactcccgacacacaggtcacggcactgtgtgttggaaattgcagtac
 actggcacggatggaccttgc aaagttcctatctcgtcagtggtcattgaacgacctaacgccagtgggcagattgg
 tcactgtcaacccttttggttcagtggtccacggccaacgctaaggctcctgattgaattggaaccaccttggagactcat
 acatagtgttgggagagggagaacaacagatcaatcaccattggcacaagcttgggaagcagcattggcaaaagcctt
 tacaaccacctcaaaaggagcgagagactagccgctctaggagacacagcttgggacttggatcagttggaggg
 gtgttcacctcagttgggaaggctgtccatcaagtggtcggaggagcattccgctcactgttcggaggcatgtcctggat
 aacgcaaggattgtcgggggtctcctgttggatgggcatcaatgctcgtgataggtccatagctctcagcttctcgc
 agttggaggagttctgctctcctctccgtgaacgtgcacgcttaa

Figura 4

MQKKRGGKTGIAVMIGLIASVGAVTLSNFQGKVMMTVNATDVTDVITPTAAGKNLCI
VRAMDVGVMCDDTITYECPVLSAGNDPEDIDCWCTKSAVYVRYGRCTKTRHSRRS
RRSLTVQTHGESTLANKKGAWMDSTKATRYLVKTESWILRNPGYALVAAVIGWML
GSNTMQRVVFVLLLLVAPAYSFNCLGMSNRDFLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIM
SKDKPTIDVKMMNMEAVNLAEVRSYCYLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRADPA
FVCRQGVVDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFACSTKAIGRTILKENIKYEVAIFVHGP
TTVESHGNYSTQVGATQAGRFSITPAAPSYTLKLGEYGEVTVDCEPRSGIDTNAYY
VMTVGTKTFLVHREWFMDLNLPWSSAGSTVWRNRETLMFEFEPHATKQSVIALGS
QEGALHQALAGAIPVEFSSNTVKLTSGHLKCRVKMEKLQLKGTTYGVCSKAFKFLG
TPADTGHGTVVLELQYTGTGDPCKVPISVASLNDLTPVGRLVTVPFVSVATANAK
VLIELEPPFGDSYIVVGRGEQQINHHWHKSGSSIGKAFTTTTLKGAQRALALGDTAWD
FGSVGGVFTSVGKAVHQVFGGAFRSLFGGMSWITQGLLGALLLWMGINARDRSIAL
TFLAVGGVLLFLSVNVHA

Figura 5

atgaacaggaggaaaagatccgtgaccatgctcctcatgctgctgcccacagtctggttccatttgaccacacga
 gggggagagccacacatgatagtttagtaagcaggaaagaggaaagtcactcttgttcaagacctctgcaggtgtca
 atatgtgactctcattgcatggttgggagagttatgtgaggacacaatgacttcaaatgcccccgatcactgag
 gcggaaccagatgacgttgactgctggtgcaatgccacagacacatgggtgacctatgggacgtgttctaaaccgg
 tgaacaccgacgagacaaacgttccgtggcactggccccacacgtgggacttggctagaaacaagaaccgaaac
 atggatgtcctctgaaggcgccgtgaaacaaatacaaaaagtggagacttgggcttggagacaccaggattcacgg
 tgatagctcttttttagcacatgccataggaacatccatcactcagaaagggatcatttctcgtctgatgtggttaaca
 ccatcaatggccatgcatgctggtggaataggcaacagagacttccgtgaaggactgtcaggagcaacgtgggtgg
 acgtggttattggagcatggaagctgctgaccacatggcaaaaaataaaccaacattggacattgaactcttgaag
 acggaggtcacgaacccctgccgtcttgcgcaaattgtgcatgaagctaaaatatcaaacaccaccaccgattcaag
 atgtccaacacaaggagaggctacactggtggaagaacaagacgcgaacttgtgtgtcgacgaacggtgtggac
 agaggctggggcaatggctgaggactattggaaaaggaagcctactgacgtgtgctaagtcaagtgtgtgacaaa
 actggaaggaaagatagttcaatatgaaaacttaaaataltcagtgatagtcactgtccacacaggggaccagcacc
 aggtgggaaacgagactacagaacatggaacaattgcaaccataacacctcaagctcctacgtcggaatacagtt
 gacagactacggaacccttactgactgctcaccacgaacagggtggactttaatgaggtggtgctattgacaat
 gaaagaaaaatcatggttgtccacaaacaatggttctagacttaccactgccttggacttcgggggcttcaacatccc
 aagagacttgaacagacaagatttgcgtgtcacattcaagacagctcatgcaaagaagcaggaagtagtctgact
 gggatcacaggaaggagcaatgcactgctgaccggggcgacagaaatccagacgtcaggaacgacaaca
 atcttgcaggacacctgaaatgcagattaaaaatggataaactgactttaaagggtatgcatatgtgatgtgcacag
 gctcatttaagctagagaagggaagtggctgagaccagcatggaactgtcctagtgcagggttaaatacgaagggaac
 agatgcgcatgcaagatcccccttttcgacccaagatgagaaaggagtgaaccagaatgggagattgataacagcc
 aatcccatagtactgacaaagaaaaaccaatcaacattgagacagaaccaccttttggtgagagctacatcatagta
 ggggcagggtgaaaaagccttgaactaagctgggtcaagaaagggaagcagcatagggaaaatgttcgaagcaatc
 gcccaggagcacgaaggatggctatcctgggagacaccgcattgggacttcggctctataggaggagtgttacgtc
 tgtgggaaaattgttacaccaggttttggaaaccgatacggggctcgttgcagcggcgttcttgaccatgaaaatag
 gaatagggatctgctgacatgggtgggattaaattcaaggagcgcgtcgttccgatgacgtgcattgcagttggcatg
 gttacactgtacctaggagtcattggttaa

Figura 6

MNRRKRSVTMLLMLLPTVLAFLHTTRGGEPHMIVSKQERGKSLLFKTSAGVNMCTLI
 AMDLGELCEDTMTYKCPRITEAEPDDVDCWCNATDTWVTYGTCSQTGEHRRDKR
 SVALAPHVGLGLETRTETWMSSEGAWKQIQKVETWALRHPGFTVIALFLAHAIGTSI
 TQKGIIFILLMLVTPSMAMRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKNKP
 TLDIELLKTEVTNPAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTVV
 DRGWGNCGLFGKGSLLTCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHVG
 NETTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGTLTLDSPRTGLDFNEVVLLTMKEKSWLVHK
 QWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALT
 GATEIQTSGTTTIFAGHLKCRCLKMDKLTGKMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLV
 QVKYEGTDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRILITANPIVTDKEKPINIETEPFPGESYIIVG
 AGEKALKLSWFKKGSSIGKMFEAARGARRMAILGDTAWDFGSIGGVFTSVGKLVH
 QVFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSASLSMTCIAVGMVTLYLGVMV

Figura 7

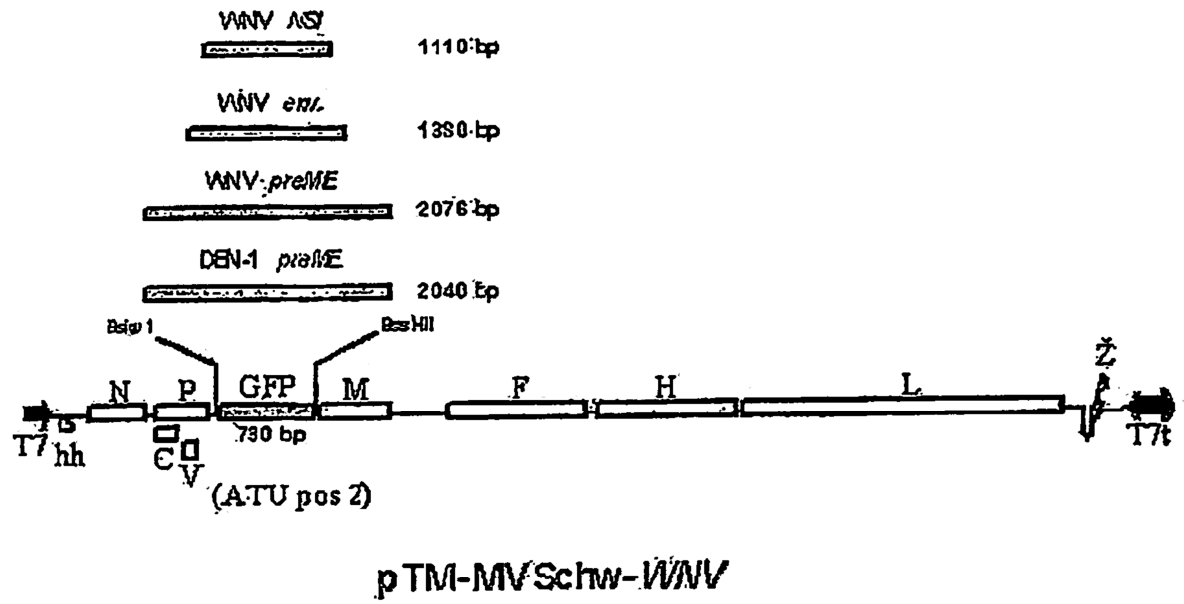


Figura 8

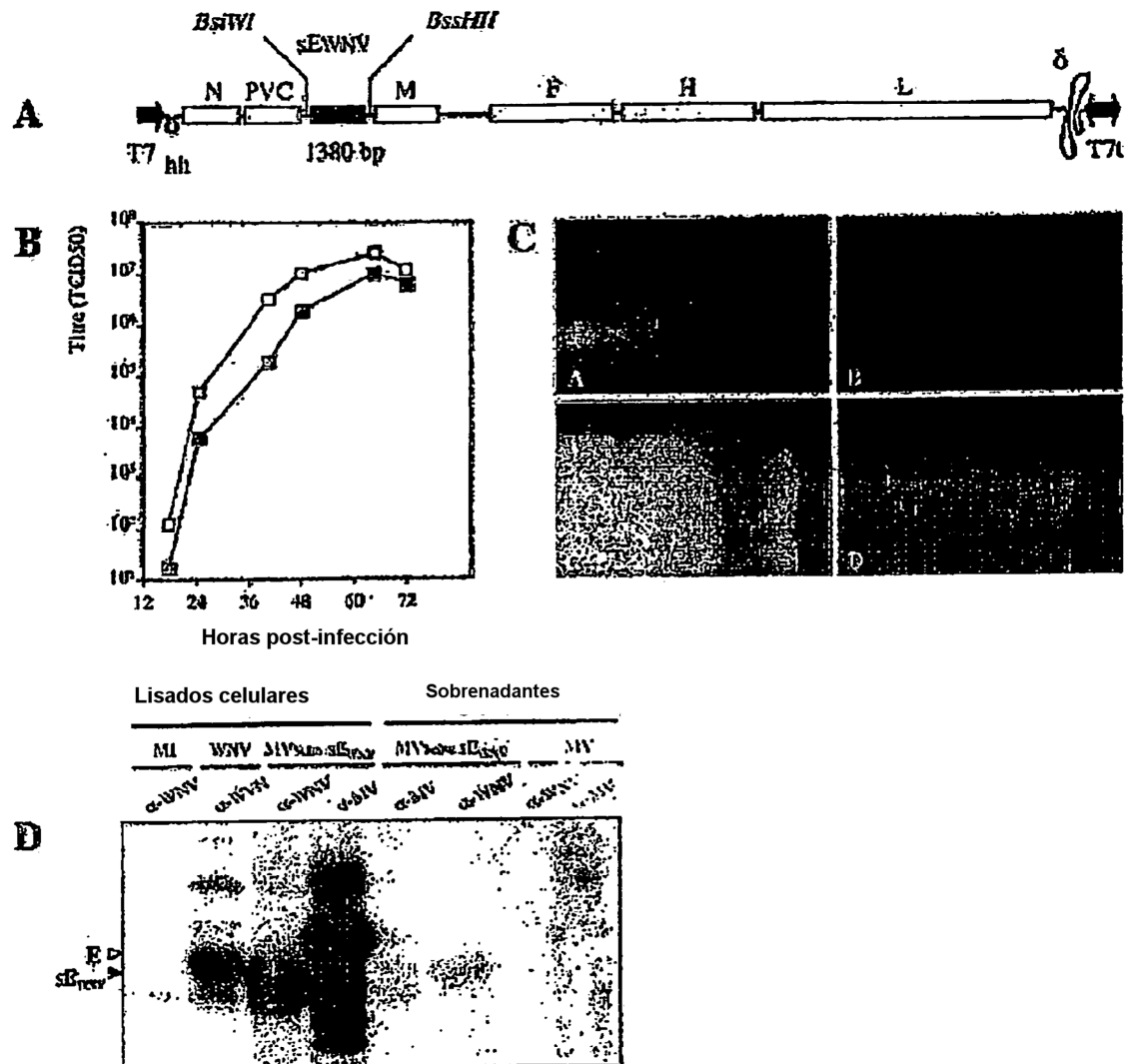


Figura 9

