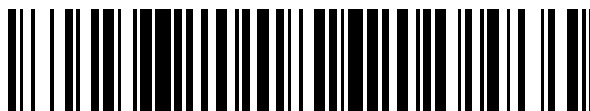


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 472**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2012 E 12702953 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2670843**

54 Título: **Vacunas multivalentes para el virus de la rabia y filovirus**

30 Prioridad:

03.02.2011 US 201161439046 P

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

10.02.2015

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE U.S.A, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPT. OF
HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
Office Of Technology Transfer 6011 Executive
Blvd. Suite 325
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**BLANEY, JOSEPH E.;
PARAGAS, JASON;
JAHRLING, PETER;
JOHNSON, REED y
SCHNELL, MATHIAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 528 472 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

Vacunas multivalentes para el virus de la rabia y filovirus

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de las vacunas y a métodos y composiciones para el tratamiento y/o la inmunización frente a las infecciones virales. En particular, la presente invención se refiere a vacunas multivalentes como un solo agente terapéutico o inmunización frente a infecciones con uno de un virus de la rabia y/o un filovirus, o con ambos, tales como virus del Ébola o virus de Marburg.

2. Antecedentes

- 10 *Filoviridae* es una familia de virus (p. ej., filovirus o familia de filovirus) que incluye principalmente los filovirus virus del Ébola y virus de Marburg y que causa brotes de fiebre hemorrágica altamente letal en seres humanos y primates no humanos que conducen a la muerte de más de 24.000 personas en África cada año. El reservorio natural de los filovirus no se conoce, y en la actualidad no hay vacunas disponibles ni tratamientos terapéuticos eficaces para las infecciones por filovirus que sean seguras y efectivas.

- 15 Filovirus son virus de ARN monocatenario, de sentido negativo, que tienen un aspecto filiforme que afectan a seres humanos y a primates no humanos. El genoma del virus del Ébola consta de una sola cadena de ARN de sentido negativo que es de aproximadamente 19 kb de longitud. Este ARN contiene siete genes dispuestos secuencialmente que producen 8 ARNms tras la infección (como se representa en la Fig. 1). Viriones del virus del Ébola (tal como se representa en la Fig. 2) al igual que viriones de otros filovirus, contienen siete proteínas: (1) una glicoproteína de superficie (GP - siglas en inglés), (2) una nucleoproteína (NP), (3-6) cuatro proteínas estructurales del virión (VP40, VP35, VP30 y VP24) y una (7) ARN polimerasa dependiente de ARN (L). La glicoproteína del virus del Ébola es diferente de otros filovirus, debido a que es codificada en dos marcos de lectura abiertos. Se necesita una edición transcripcional para expresar la forma de transmembrana que se incorpora en el virión. La forma sin editar produce una glicoproteína secretada no estructural (sGP- siglas en inglés) que es sintetizada en grandes cantidades en una fase temprana durante el curso de la infección. Poco se sabe sobre las funciones biológicas de estas proteínas y no se conoce por completo qué antígenos contribuyen de manera importante en la protección (p. ej., incluyendo una respuesta de células T humoral y/o citotóxica).

- 30 El virus de Marburg es sustancialmente de estructura idéntica al virus del Ébola, aunque provoca diferentes anticuerpos. El genoma del virus de Marburg consiste de manera similar de una sola cadena de ARN de sentido negativo que es de aproximadamente 19,1 kb de longitud y que codifica una serie de polipéptidos que corresponden en secuencia y función a los de los virus del Ébola, aunque las regiones intergénicas exactas son diferentes entre los dos virus. Así, el virus de Marburg consiste en siete polipéptidos que son, al igual que en el virus del Ébola, (1) una glicoproteína de superficie (GP), (2) una nucleoproteína (NP), (3-6) cuatro proteínas estructurales del virión (VP40, VP35, VP30 y VP24), y (7) una ARN polimerasa dependiente de ARN (L).

- 35 Los viriones de cada uno de los filovirus tienden a ser largos y filamentosos, esencialmente baciliformes, pero a menudo adoptan una forma de "U", con una longitud de hasta 14.000 nm y un diámetro medio de aproximadamente 80 nm. Estos virus consisten en una nucleocápside, rodeada por una cápside helicoidal estriada transversalmente. Existe un canal axial en la nucleocápside, y todo el virión está rodeado por una unidad de lipoproteínas derivada de la célula huésped. Además, hay picos de 7 nm distanciados 10 nm visibles en la superficie del virión. Véase la Fig. 2.

- 40 Al entrar en una célula infectada, los filovirus transcriben su ARN y los virus se replican en el citoplasma de la célula infectada. La replicación es mediada por la síntesis de un cadena de ARN positiva antisentido, que se proporciona como un molde para genomas virales adicionales. Conforme avanza la infección, el citoplasma de la célula infectada desarrolla cuerpos de inclusión que contienen nucleocápsides virales, que luego se convierten en altamente estructuradas. Los virus se ensamblan a continuación y brotan de la célula huésped, obteniendo su envoltorio de lipoproteínas de la membrana externa de la célula infectada.
- 45

Los filovirus virus del Ébola y virus de Marburg provocan una fiebre hemorrágica grave después de un período de incubación de aproximadamente cuatro a dieciséis días. Una persona infectada desarrolla típicamente síntomas iniciales que incluyen fiebre repentina, escalofríos, dolores de cabeza intensos, anorexia y mialgia. Náuseas, vómitos, dolor de garganta, dolor abdominal y diarrea se desarrollan pronto, seguido de una hemorragia grave,

choque y fallo multiorgánico entre aproximadamente cinco y siete días. Típicamente, la muerte se produce entre los siete y dieciséis días.

Se reconoce generalmente que el género virus del Ébola comprende cuatro especies principales, cada una de las cuales comprende, además, un cierto número de diferentes cepas. A nivel de género, el virus del Ébola comprende cuatro especies conocidas como virus del Ébola Zaire (ZEBOV), Sudán (SEBOV), Costa de Marfil (CEBOV) y Reston (RBOV). Una quinta especie potencial, Bundibugyo (BEBOV), se asoció recientemente con un brote de fiebre hemorrágica en Uganda en 2007. Desde la identificación del EBOV Zaire en los años 1970, se han reseñado al menos 20 brotes humanos en el África Central. Mientras que las tasas de letalidad varían entre los brotes y entre las especies de EBOV, ZEBOV ha sido asociado con una mortalidad de hasta un 90%. Además, los brotes de infección letal por EBOV han sido reseñados en primates no humanos (NHPs- siglas en inglés) endémicos, incluyendo gorilas y chimpancés. El EBOV también ha surgido como una preocupación significativa de defensa biológica, debido a su extrema virulencia y a su capacidad de inducir la enfermedad por la vía de aerosol.

Si bien no hay vacunas disponibles ni tratamientos terapéuticos eficaces para las infecciones por filovirus, se han empleado varias estrategias para identificar candidatos a vacunas que confieren protección frente a EBOV. La inmunización con la glicoproteína (GP) del EBOV, que media en la fijación y la entrada viral, ha demostrado que confiere protección frente a diversas especies de EBOV en NHPs. El suministro de GP mediante vacunación de ADN, partículas similares a virus, o por expresión de virus recombinantes, incluyendo adenovirus, virus de la estomatitis vesicular, o paramixovirus ha demostrado inducir una inmunidad humoral y celular a EBOV, a pesar de que los mecanismos exactos de la inmunidad protectora permanecen definidos de una manera incompleta. Debido a los estudios de protección cruzada fallidos y a la conocida alta divergencia de la secuencia de aminoácidos de GP a lo largo de las especies del EBOV, puede ser necesaria una vacuna multivalente para proporcionar protección frente a todas las especies del EBOV.

Recientemente, la protección cruzada frente al EBOV Bundibugyo se demostró mediante vacunación de refuerzo principal de ADN/adenovirus con EBOV Sudán y ZEBOV, indicando el potencial de protección heteróloga. En conjunto, estas estrategias de vacunación sugieren que la inmunización eficaz con la GP de EBOV confiere protección contra el desafío letal de EBOV en roedores y NHPs. Dado que el curso de la enfermedad de EBOV en los seres humanos se asemeja al observado en NHPs, es posible que la vacunación de seres humanos sea un medio eficaz de prevención de la enfermedad. A pesar de ello, sigue habiendo obstáculos que dificultan el desarrollo de estas vacunas, incluyendo consideraciones de seguridad, inmunidad del vector preexistente, y problemas de fabricación, dosis u horario. Como tal, se desea en gran medida en la técnica el desarrollo de candidatos de vacunas adicionales para tratar o inmunizar frente a un flavivirus, p. ej. virus del Ébola o virus de Marburg.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas construcciones de vacunas recombinantes que se basan en la modificación genética de un vector de una vacuna de virus de la rabia para expresar una o más glicoproteínas inmunogénicas de filovirus, p. ej., una glicoproteína (GP) del virus del Ébola o virus de Marburg, de tal manera que las respuestas inmunes humorales y/o celulares son inducidas contra la infección por un virus de la rabia y/o un filovirus tras la administración de una construcción de vacuna recombinante de la invención o un virión recombinante basado en ella. Preferiblemente, el vector de la vacuna del virus de la rabia se atenúa para eliminar o mitigar a un nivel seguro su capacidad de daño neurológico. La divulgación también proporciona composiciones y métodos para inmunizar frente a o tratar infecciones por cualquiera de un virus de la rabia y un filovirus, o por ambos, p. ej., virus del Ébola o virus de Marburg. A las construcciones de vacunas recombinantes de la invención se las puede aludir como "bivalentes" o "multivalentes" debido a que son como una única construcción capaz de la inducción simultánea de una respuesta inmune contra dos o más patógenos virales, p. ej., virus de la rabia y virus del Ébola. Las construcciones de vacuna de la invención se pueden utilizar de forma profiláctica, es decir, para inducir una respuesta inmune humoral y/o celular como protección contra una infección o un desafío posterior por uno o ambos de un virus de la rabia y/o un filovirus, o se pueden utilizar terapéuticamente, es decir, para inducir una respuesta inmune humoral y/o celular para ayudar a neutralizar o eliminar una infección preexistente por uno o ambos de un virus de la rabia y un filovirus.

Así, la presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para su uso en la inducción de una respuesta inmune que confiere protección doble frente a infecciones por cualquiera o ambos de un virus de la rabia y un filovirus, y/o que se puede utilizar terapéuticamente para una infección existente con el virus de la rabia y/o un filovirus para tratar al menos un síntoma de la misma y/o para neutralizar o eliminar los agentes infectantes.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un vector de virus de la rabia recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma.

En aún otro aspecto, la presente invención implica una vacuna multivalente que es eficaz para proteger frente a la infección con uno de un virus de la rabia y un filovirus, o con ambos, que comprende un vector de virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma.

5 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una vacuna multivalente que es eficaz para proteger contra la infección con uno o ambos de un virus de la rabia y un filovirus, que comprende un vector de virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma.

10 En otro aspecto todavía, la presente invención implica una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna multivalente que comprende un vector de la vacuna del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma, para uso en un método de inducir una respuesta inmune protectora frente a una infección por un filovirus y un virus de la rabia, o por ambos, en un sujeto.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna multivalente que comprende un vector de la vacuna del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma, para uso en un método para inducir a anticuerpos neutralizantes contra un filovirus y/o un virus de la rabia en un sujeto infectado con o que ha estado expuesto a uno o ambos de dichos virus.

20 En aún un aspecto adicional, la invención implica una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna multivalente que comprende un vector de la vacuna del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma, en donde dicha vacuna induce una respuesta inmune eficaz contra uno o ambos de dichos virus, para uso en un método para tratar a un sujeto infectado con un filovirus y/o un virus de la rabia.

25 En determinadas realizaciones, la glicoproteína del filovirus codificada por el vector de la vacuna de la rabia recombinante utilizado en los diferentes aspectos de la invención es una glicoproteína de virus del Ébola. La glicoproteína del virus del Ébola puede ser un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (de ZEBOV), SEQ ID NO: 2 (de SEBOV), SEQ ID NO: 3 (de CEBOV), SEQ ID NO: 4 (de REBOV), o SEQ ID NO: 5 (de BEBOV), según se proporciona en la Tabla 1 y en otras partes.

30 La glicoproteína de filovirus codificada por el vector de la vacuna de la rabia recombinante utilizado en los diferentes aspectos de la invención puede ser una glicoproteína del virus de Marburg. La glicoproteína del virus de Marburg puede ser un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (de la cepa Musoke del virus de Marburg), según se proporciona en la Tabla 1 y en otras partes.

35 El vector del virus de la rabia recombinante utilizado en los diversos aspectos de la invención puede expresar además una o más proteínas de filovirus o fragmentos inmunogénicos de las mismas adicionales. Las proteínas de filovirus adicionales pueden ser una proteína (un fragmento inmunogénico de la misma) seleccionada del grupo que consiste en una nucleoproteína (NP) de filovirus, proteína estructural del virión (p. ej., una proteína del virus del Ébola VP40, VP35, VP30 o VP24) o una proteína de replicación viral (p. ej., una ARN polimerasa ARN dependiente del virus del Ébola (L)). Las proteínas de filovirus adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en una cualquiera de las proteínas del virus del Ébola de SEQ ID NOS: 7-36 de la Tabla 2 y según se proporcionan en esta memoria, o un fragmento inmunogénico de las mismas. Las proteínas de filovirus adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en una cualquiera de las proteínas del virus de Marburg de SEQ ID NOS: 37-42 de la Tabla 2, y según se proporcionan en esta memoria.

40 Cualquier proteína de filovirus expresada por los vectores de vacuna de virus de la rabia recombinantes utilizados en los diversos aspectos de la invención se puede expresar como fragmentos inmunogénicos. Un fragmento inmunogénico de una proteína de filovirus es, para los fines de esta invención, cualquier segmento de una proteína de filovirus que sea capaz de inducir sustancialmente la misma respuesta inmune que la proteína de longitud completa homóloga. Sustancialmente, la misma respuesta inmune puede referirse, por ejemplo, a los casos en los que la concentración de anticuerpos inducidos contra el fragmento es aproximadamente la misma, o al menos aproximadamente 75%, u 80%, o 90%, o 95%, o 99% o más la concentración de anticuerpos inducidos contra la proteína de filovirus de longitud completa sometida a ensayo bajo las mismas condiciones.

50 La vacuna del virus de la rabia recombinante se puede atenuar de tal manera que sus propiedades de neurovirulencia se han eliminado o se han mitigado sustancialmente de modo que se evita sustancialmente el daño neurológico típico del virus de la rabia.

La vacuna del virus de la rabia recombinante puede ser la vacuna viva atenuada "SAD B19 RABV ", que fue atenuada por el paso de cultivo del tejido y se ha utilizado como una vacuna oral viva para la vida salvaje en Europa durante muchos años (véase Conzelmann et al., 1990; Vos et al., 1999; y Vos et al., 2002 identificados bajo Referencias en este documento).

La vacuna del virus de la rabia recombinante se puede derivar de SAD B19 RABV mediante la introducción de cambios genéticos adicionales, lo que resulta en una mayor atenuación del virus. Para el propósito de la invención, el término "derivado", se refiere a una molécula de ácido nucleico modificado (p. ej., vector de la vacuna) con relación a una molécula de tipo salvaje o de otro origen en la que se introducen los cambios, en donde los cambios incluyen cambios genéticos y/o cambios químicos, incluyendo sustituciones en un solo nucleótido (mutaciones puntuales), deleciones, inserciones, inversiones, múltiples mutaciones puntuales, y cambios químicos tales como metilación o acetilación del ADN. El SAD B19 RABV se puede derivar para formar "BNSP" mediante la introducción de una nueva secuencia señal de la transcripción de parada y arranque RABV que está flanqueada por sitios de restricción *BsiWI* y *NheI* únicos entre los genes de nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) para la introducción de genes extraños (véase la Fig. 3 y McGettigan et al., 2003b). El vector BNSP se derivó (y atenuó) adicionalmente mediante la introducción de un cambio de Arg → Glu en el aminoácido 333 de la proteína g del RABV (véase McGettigan et al., 2003b). Se ha demostrado que la mutación 333 atenúa en gran medida la neurovirulencia de RABV en ratones adultos.

En determinadas otras realizaciones, la invención proporciona células huésped que pueden ser transfectadas con las vacunas del virus de la rabia recombinante de la invención para los propósitos que incluyen la expresión de proteínas codificadas por las vacunas de virus y/o para la generación de viriones de la rabia recombinantes, que pueden aislarse a partir de las mismas y utilizarse en composiciones de vacuna de acuerdo con otros aspectos y realizaciones de la invención. Células huésped adecuadas pueden incluir cualquier célula susceptible de ser transfectada o infectada *in vitro* con una vacuna del virus de la rabia, incluyendo cualesquiera líneas de células humanas o líneas de células animales. Tales líneas de células y su uso en la expresión de proteínas y en la formación de viriones de la rabia son bien conocidas en la técnica y se describen en más detalle, por ejemplo, en Barrett PN et al., Expert Rev Vaccines. mayo de 2009; 8(5):607-18; Tordo N et al., Dev Biol (Basel). 2008; 131:467-76; Toovey S. et al., Travel Med Infect Dis. noviembre de 2007; 5(6):327-48; Chelbi-Alix MK, J Interferon Cytokine Res. mayo de 2006; 26(5):271-80; Morenweiser R. et al., Gene Ther. octubre de 2005; 12 Supl 1:S103-10; Morimoto K et al., Virus Res. julio de 2005; 111(1):61-7. Epub 11 de abril de 2005; Finke S et al., Virus Res. agosto de 2005; 111(2):120-31; y Halder M., Altern Lab Anim. enero-febrero de 2002; 30(1):93-108; Montagnon BJ et al., Dev Biol Stand. 1998; 93:119-23.

Se prefiere que los virus de la vacuna de la rabia y la producción de cualesquiera viriones de virus y su uso como vacunas se realice de acuerdo con cualesquiera requisitos nacionales y/o internacionales de salud y seguridad necesarios en relación con el virus de la rabia y filovirus, p. ej., de acuerdo con los requisitos del Centro de Control de Enfermedades ("CDC") de EE.UU. o la Organización Mundial de la Salud ("OMS").

Las composiciones de vacuna de la invención, en determinadas realizaciones, pueden incluir un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se describe más adelante.

Los autores de la invención han construido específicamente los cuatro vectores de la vacuna del virus de la rabia recombinantes de los Ejemplos, que incluyen: (a) BNSP333-GP (una vacuna del vector del virus de la rabia recombinante, competente de la replicación, que expresa GP del ZEBOV de la cepa Mayinga); (b) BNSP333-GP_{GCD} (una vacuna del vector del virus de la rabia recombinante, competente de la replicación, que expresa el ectodominio y el dominio de transmembrana de la GP de ZEBOV de la cepa Mayinga fusionados con el dominio citoplásmico G del RABV (GCD)); (c) BNSPΔG-GP (una vacuna del vector del virus de la rabia recombinante, deficiente de la replicación, que expresa GP de ZEBOV de la cepa Mayinga); (d) BNSPAG-GP_{GCD} (una vacuna del vector del virus de la rabia recombinante, deficiente de la replicación, que expresa el ectodominio y el dominio de transmembrana de la GP de ZEBOV de la cepa Mayinga fusionados con el dominio citoplásmico G del RABV (GCD)). Se apreciará, además, que cuando se utiliza un vector de la vacuna de la rabia deficiente de la replicación, tal como en (c) y (d) de arriba, las líneas de células que proporcionan las funciones ausentes/defectuosas *en trans* pueden ser necesarias para propagar los virus y/o para permitir la preparación de viriones. Estas funcionalidades *en trans* y líneas de células son bien conocidas en la técnica y pertenecen al uso de los vectores de la vacuna de la rabia.

Las secuencias de nucleótidos completas de estas cuatro construcciones de vacuna son como sigue: BNSP333-GP (SEQ ID NO: 43); BNSP333-GP_{GCD} (SEQ ID NO: 44); BNSPΔG-GP (SEQ ID NO: 45); y BNSPAG-GP_{GCD} (SEQ ID NO: 46), secuencias que se proporcionan en esta memoria.

Estas y otras realizaciones se describen o son obvias a partir de y quedan abarcadas por la siguiente Descripción Detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor en unión con los dibujos que se acompañan.

La Figura 1 proporciona una representación esquemática del genoma del virus del Ébola.

- 5 La Figura 2 proporciona una representación esquemática de un virión del virus del Ébola ensamblado.

- La Figura 3 proporciona un esquema de las construcciones de virus preparadas de acuerdo con los Ejemplos. Se ilustran genomas de ARN de sentido negativo para las construcciones de vacunas parentales de RABV, BNSP y BNSP333 (McGettigan et al., 2003a), y cuatro vectores de la vacuna del RABV que expresan la glicoproteína (GP) de la cepa Mayinga del virus del Ébola Zaire con o sin glicoproteína G (Δ G) del RABV. La mutación 333 resulta en un cambio de Arg→Glu en el aminoácido 333 de G del RABV, que se ha demostrado atenúa en gran medida la neurovirulencia de vectores de la vacuna del RABV en ratones adultos (McGettigan et al, 2003a; McGettigan et al, 2003b). La GP de ZEBOV se expresa auténticamente o con el dominio citoplásmico G del RABV (GCD) fusionado a su ectodominio y dominio de la transmembrana. El GCD se representa por un cuadro negro.

- 15 Las Figuras 4A-4D proporcionan imágenes de inmunofluorescencia representativas que demuestran que los virus Δ G se restringen en su crecimiento utilizando un ensayo de propagación de virus. Células BSR (Figuras 4A y 4C) o células BSR *trans*-complementarias que expresan G del RABV (Figuras 4B y 4D) se infectaron a una MOI (multiplicidad de infección) de 0,001 con BNSP Δ G-GP (Figuras 4A y 4B) o BNSP Δ G-GP_{GCD} (Figuras 4C y 4D). Tres días más tarde, las células fueron fijadas e inmunoteñidas para la nucleoproteína RABV intracelular. Se muestran imágenes representativas en un aumento de 10x del microscopio fluorescente.

- 20 Las Figuras 5A-5C ilustran la expresión de GP por diversas construcciones de vacunas RABV *in vitro*. (Figura 5A) análisis de borrones de transferencia Western de GP expresada por virus indicados a las 24-72 horas. Lisados de células infectadas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los borrones se sondearon con anti-EBOV de mono policlonal. (Figura 5B) Gel de SDS-PAGE teñido con azul Coomassie de partículas de virus purificado con proteínas RABV indicadas. El borrón de transferencia Western se sondeó con sueros anti-EBOV o sueros anti-RABV P. (Figura 5C) Células BSR fueron infectadas con los virus indicados y fueron analizadas mediante microscopía electrónica doble marcado de inmuno-oro. G de RABV se detectó mediante G anti-RABV de conejo primaria, seguido de IgG anti-conejo secundaria marcado con partículas de oro de 15 nm. La GP de ZEBOV se detectó mediante anti-GP humano primario, seguido de IgG anti-humana secundaria marcado con partículas de oro de 5 nm. Aumentos para BNSP333 y BNSP333-GP – 150.000x; para BNSP333-GP_{GCD} – 210.000x.

- 30 Las Figuras 6A-6C demuestran que los virus de la vacuna RABV que expresan GP son avirulentos en ratones después de inoculación periférica. (Figura 6A) Grupos de cinco ratones BALB/c fueron inoculados IM con 5×10^5 FFU (siglas inglesas de unidades formadoras de focos) de virus vivo el día 0 o con 10 μ g de virus inactivado los días 0 y 14. Los datos son representativos de dos experimentos. (Figura 6B) Grupos de 5 ratones SW fueron inoculados con 1×10^5 FFU de los virus indicados. Los datos son representativos de dos experimentos. (Figura 6C) Grupos de ocho ratones BALB/c fueron inoculados IP con 1×10^6 FFU de los virus indicados. Los ratones inoculados por cada una de las vías se monitorizaron diariamente en cuanto a signos de morbilidad y se pesaron periódicamente durante el período de tiempo indicado.

- 40 Las Figuras 7A-7D demuestran que las vacunas del RABV que expresan GP inducen anticuerpos específicos para G de RABV y ZEBOV. Grupos de diez ratones BALB/c fueron inmunizados IM con 5×10^5 FFU de virus vivos indicados o 10 μ g de virus inactivado el día 0 (1 dosis) o los días 0 y 14 (2 dosis) para dos experimentos de estimulación independientes. El suero fue extraído el día 30 después de la inmunización (barras azules) antes de la estimulación de RABV (Figuras 7A y 7C) o la estimulación de MA-EBOV (Figuras 7B y 7D), se agruparon, y se analizó mediante ELISA dirigido contra GP de ZEBOV en una dilución 1:200

- 45 (Figuras 7A y 7B) o G de RABV en una dilución 1:300 (Figuras 7C y 7D). Los resultados en 7A, 7C y 7B, 7D son después de la estimulación de RABV o MA-EBOV, el suero se recogió, se agrupó y se sometió a ensayo de la misma manera (barras rojas). Vehículo-Ch. indica que los ratones fueron inmunizados con vehículo, pero no estimulados. Vehículo+Ch. indica que los ratones fueron inmunizados con vehículo y recibieron virus de estimulación indicados. Ningún ratón inmunizado con BNSP333 sobrevivió al estímulo con MA-EBOV.

- 50 Las Figuras 8A y 8B demuestran que las vacunas del RABV que expresan GP confieren protección frente a EBOV y RABV. Dos grupos de diez ratones BALB/c fueron inmunizados IM con 5×10^5 FFU de virus vivo indicado o 10 μ g de virus inactivado el día 0 (1 dosis) o los días 0 y 14 (2 dosis). (Figura 8) El día 77 post- inmunización, grupos de diez

ratones fueron estimulados IP con 1.000 PFU (siglas inglesas de unidades formadoras de placas) de MA-EBOV. Los ratones fueron monitorizados en cuanto a la morbilidad durante 21 días. (Figura 8B) El día 50 post-inmunización, grupos de diez ratones fueron estimulados IM con la cepa CVS-N2c del virus RABV virulenta fueron monitorizados en cuanto a la morbilidad durante 21 días.

- 5 La Figura 9 muestra que vacunas del RABV que expresan GP inducen niveles protectores de anticuerpos neutralizantes específicos para G de RABV. Grupos de cinco ratones BALB/c fueron inmunizados IM con 5×10^5 FFU del virus vivo indicado el día 0 o con 10 µg de virus inactivado los días 0 y 14 (2 dosis). El suero se extrajo el día 28 y se analizó mediante el ensayo de neutralización de RABV expresado en unidades internacionales (UI)/ml. 0,5 UI se consideran protectoras por las normas de la OMS.
- 10 Las Figuras 10A y 10B muestran evidencia de la pérdida de peso después de la estimulación con EBOV o RABV. Dos grupos de diez ratones BALB/c fueron inmunizados IM con 5×10^5 FFU del virus vivo indicado o con 10 µg de virus inactivado el día 0 (1 dosis) o los días 0 y 14 (2 dosis). (Figura 10A) El día 77 post-inmunización, grupos de diez ratones fueron estimulados IP con 1.000 PFU de MA-EBOV. Los ratones se pesaron diariamente durante nueve días y cada dos días hasta 21 días. (Figura 10B) El día 50 post-inmunización, grupos de diez ratones fueron estimulados con la cepa CVS-N2C del virus RABV virulenta y fueron pesados diariamente durante 21 días.
- 15

Las Figuras 11A y 11B son gráficos que muestran los rendimientos de virus de virus vacuna en cultivo celular. (Figura 11A) Células Vero fueron infectadas con los virus indicados a una MOI de 5. (Figura 11B) Células BSR-G (un derivado de células BHK que expresa G de RABV) fueron infectadas a una MOI de 0,01. Las monocapas infectadas fueron incubadas a 37°C durante el tiempo indicado, y se retiraron muestras a los tiempos indicados post-infección. Las concentraciones de los virus se determinaron mediante un ensayo de enfoque viral. La línea de trazos discontinuos indicaba el límite de detección.

- 20 Las Figuras 12A y 12B son gráficos que demuestran que los virus de RABV que expresan GP son avirulentos después la inoculación intracerebral (i.c.) de ratones adultos. Grupos de ocho ratones de cuatro semanas de edad fueron inyectados i.c. con 1×10^5 FFU del virus indicado y fueron monitorizados diariamente en cuanto a la supervivencia (Figura 12A) durante 28 días. Los pesos (Figura 12B) se monitorizaron en los tiempos indicados.
- 25

La Figura 13 es un gráfico que demuestra que la adición de GP a RABV no aumenta una neuroinvasión en ratones inmunodeficientes. A grupos de 8 ratones SCID de 4 - 6 semanas de edad se les inyectaron i.m. en la pata trasera 1×10^6 FFU del virus indicado y se les monitorizó diariamente en cuanto a la supervivencia durante 84 días.

- 30 La Figura 14 es un gráfico que muestra la replicación de virus de la vacuna RABV que expresan GP en cerebro de ratón lactante, sometido a ensayo por qPCR. Ratones Swiss Webster de cinco días de edad fueron inoculados i.c. con 1×10^5 FFU del virus indicado. Los días 1, 3, 5, 6, 7, 9, 14 y 21 se sacrificó a tres ratones por grupo, se generaron homogeneizados de cerebro y se produjo ADNc viral. El nivel de ARN genómico viral se determinó mediante un ensayo de RT-PCR cuantitativa específica para nucleoproteínas de RABV.
- 35

- 35 Las figuras 15A-15C muestran el análisis de co-administración de dos vacunas inactivadas: RABV-GP y un virus RABV que expresan el dominio HC50E30 de la neurotoxina botulínica (BoNT). Grupos de cinco ratones fueron inmunizados i.m. una vez (día 0) o dos veces (días 0 y 14) con los virus indicados. Están marcados los grupos que recibieron 2 inmunizaciones (2). Los virus utilizados son BNSP333-GP_{GCD} inactivado, marcado como INAC-GP_{GCD} y SPBN-HC50E30, marcado como INAC-HC50. Dosis de virus individuales se administraron a razón de 10 µg, mientras que los grupos de virus combinados, INAC-GP_{GCD} + INAC-HC50 e INAC-GP_{GCD} + INAC-HC50(2) fueron administrados a razón de 20 µg (10 µg de cada uno de los virus). El día 42, todos los ratones fueron sangrados y el suero se sometió a ensayo mediante ELISA frente a (Figura 15 A) G de RABV, (Figura 15B) BoNT HC50 y (Figura 15C) GP de ZEBOV.
- 40

- 45 Las Figuras 16A-16C muestran la inducción de la respuesta de anticuerpos específica para la GP en presencia de inmunidad RABV pre-existente. Grupos de cinco ratones fueron inmunizados una vez el día 0 con el vehículo, 10 µg de SPBN-HC50E30 inactivado o 10 µg de BNSP333-GPGCD inactivado. Un cuarto grupo fue inmunizado con 10 µg de SPBN-HC50E30 el día 0 seguido de 10 µg de BNSP333-GPGCD inactivado el día 28. Por lo menos cuatro semanas después de la inmunización, el suero se sometió a ensayo mediante ELISA frente a (Figura 16A) G de RABV, (Figura 16B) BoNT HC50 y (Figura 16C) GP de ZEBOV.
- 50

- 50 Las Figuras 17A y 17B demuestran que virus vacuna RABV vivos y muertos que expresan GP de ZEBOV inducen una inmunidad mediada por células T (Figura 17A) primaria y (Figura 17B) de recuperación de la memoria. Grupos de diez ratones fueron inmunizados i.m. con 1×10^5 FFU del BNSP vivo (virus RABV) o i.p. con 1×10^7 PFU de VACV-GP, un virus vacuna que expresa GP de ZEBOV. 10 µg de INAC-BNSP333-GP_{GCD} se administró i.m. a dos grupos; una inmunización o dos el día 0 y el día 14. Para el análisis (Figura 17 A) de la inmunidad mediada por células T

- primaria, se retiraron los bazo de cuatro ratones por grupo el día 7 post-inmunización. Se generaron suspensiones de esplenocitos y se utilizaron en un ELISPOT de interferón- γ murino (R and D Systems) utilizando como estimulación una agrupación de péptidos GP de ZEBOV o péptido control de la gripe no relacionado. Para el análisis (Figura 17B) de la respuesta de células T de la memoria, los seis ratones por grupo restantes fueron estimulados i.p. con 1×10^7 PFU de VACV-GP aproximadamente 4 semanas post-inmunización para inducir una respuesta de células T de memoria. Cinco días más tarde, se retiraron los bazo y el ELISPOT se realizó como se describe anteriormente para la respuesta primaria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- La presente invención puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención y a los Ejemplos incluidos en la misma. Antes de que se revelen y describan los presentes métodos y técnicas, se ha de entender que esta invención no se limita a métodos y composiciones específicos ya que éstos, por supuesto, pueden variar. También se ha de entender que la terminología utilizada en esta memoria es con el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el significado comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

Tal como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen una referencia plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un gen" es una referencia a uno o más genes, e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

- Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "muestra biológica" o "muestra de un paciente" o "muestra de ensayo" o "muestra", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a una muestra obtenida de un organismo o de componentes (p. ej., células) de un sujeto o paciente con el propósito de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés. La muestra puede ser, por ejemplo, la sangre que potencialmente está en riesgo de contener una infección con el virus del Ébola o el virus de la rabia. Una muestra de este tipo se puede obtener para evaluar la presencia de anticuerpos específicos para el virus del Ébola o un virus de la rabia tras una sospecha de infección o después de la vacunación utilizando una construcción de vacuna de la invención. La invención contempla la práctica de cualquier seguridad y/o procedimientos, impuestos por el Gobierno, para la manipulación y el procesamiento de cualquier muestra sospechosa de contener una infección con un virus de la rabia o un filovirus, p. ej., virus del Ébola o virus de Marburg.
- Tal como se utiliza en esta memoria, un "sujeto" incluye un ser humano, primate no humano (p. ej., simio o mono), animal, p. ej., caballo, burro, cerdo, ratón, hámster, mono, pollo e insectos tal como mosquitos.

- Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "se une específicamente a" o "es específico para" en el contexto de las interacciones anticuerpo/antígeno está destinado a dar a entender la unión específica de un anticuerpo a un antígeno afín a través de uno o más epítomos específicos reconocidos por el anticuerpo, sin unirse sustancialmente a las moléculas que carecen de tales epítomos.

- Tal como se utiliza en esta memoria, el término "tratamiento" o "tratar" incluye cualquier proceso, acción, aplicación, terapia o similar, en donde a un sujeto (o paciente), incluido un ser humano, se le proporciona o administra un agente o composición, p. ej., una composición de vacuna terapéutica, con el objetivo de mejorar el estado del sujeto, directa o indirectamente, o ralentizar la progresión de una afección o trastorno en el sujeto (p. ej., fiebre hemorrágica o sangrado debido a la infección por virus del Ébola), o de mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno que esté bajo tratamiento. Tal como se utiliza en el contexto de la enfermedad provocada por la rabia, virus del Ébola u otro filovirus, los términos "tratar", "tratamiento", y similares, se refieren al consuelo o alivio de un proceso patológico mediado por dichos virus.

- La expresión "terapia de combinación" o "co-terapia" significa la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una enfermedad, afección y/o trastorno, p. ej., fiebre hemorrágica inducida por filovirus. Tal administración abarca la "co-administración" de dos o más agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea. Una terapia puede basarse en las vacunas de doble protección de la invención. Una segunda terapia puede basarse en una terapia conocida para el trastorno que esté siendo tratado. Por ejemplo, fármacos anti-virus alternativos pueden co-administrarse con los vectores de vacuna de la invención. El orden de administración de dos o más agentes terapéuticos secuencialmente co-administrados no está limitado. La administración de los dos o más agentes terapéuticos también se puede realizar por diferentes vías, p. ej., por una vía local (p. ej., la administración por la mucosa de una doble vacuna de la invención) y una vía sistémica (p. ej., la administración parenteral de un inhibidor de molécula pequeña anti-rabia o anti-filovirus).

Tal como se utiliza en esta memoria, las frases "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o gestión de procesos patológicos mediados por una infección con el virus de la rabia, virus del Ébola u otro filovirus, o un síntoma evidente de procesos patológicos mediados por la rabia o el virus del Ébola u otro filovirus. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz puede ser determinada fácilmente por un médico ordinario, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica tales como, p. ej., el tipo de procesos patológicos mediados por la infección por un virus, el historial del paciente y la edad, la fase de los procesos patológicos mediados por la infección por el virus, y la administración de otros procesos anti-patológicos mediados por la infección.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de una construcción de vacuna y un soporte farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en esta memoria, "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una vacuna eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo pretendido. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando existe al menos una reducción del 25% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para llevar a cabo al menos una reducción del 25% en ese parámetro. Además, la composición farmacéutica puede estar diseñada para potenciar las células diana, implicadas en la infección por el virus subyacente tales como células dendríticas, macrófagos, hepatocitos y otras células parenquimatosas. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el producto objeto es apropiado para su uso en un producto farmacéutico.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "construcción de vacuna" se refiere a una molécula de ácido nucleico que constituye el vector del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus (p. ej. glicoproteína del virus del Ébola) de la invención. La invención también contempla el uso de "viriones" de vacuna recombinantes que se producen por las construcciones de vacuna de la invención cuando se introducen en una célula huésped susceptible a una infección por la misma, y que luego se les permite que se propaguen y formen viriones de virus enteros en la célula, que después se obtienen y/o purifican. Un "virión" se refiere a una partícula de virus completa que resulta de un ciclo de infección del genoma de la rabia recombinante en una célula capaz de acoger el genoma de la rabia. La "vacuna" o "vacunas recombinantes" de la invención abarcan tanto las "vacunas genéticas", es decir, las construcciones de vacuna de la invención, y las vacunas tradicionales, que son los propios viriones. Dependiendo del genoma recombinante de la construcción de vacuna, los viriones pueden ser competentes de la replicación o deficientes de la replicación. Cuando son deficientes de la replicación, su propagación en células huésped *in vitro* o *in vivo* puede requerir un virus o célula "helper", en el que determinadas funciones de replicación se proporcionan en *trans* ya sea por el virus helper o la célula en la que está teniendo lugar la infección. Las composiciones de vacuna también pueden incluir ambas construcciones de vacunas, así como los propios viriones. Los viriones también pueden ser del tipo de "virus muerto", con lo que el virión se trata químicamente o se desactiva de otro modo por algunos medios de desactivación de tal manera que el virión no tiene o tiene una mínima capacidad de replicación. Vacunas de virus muertos generalmente se basan en sus polipéptidos presentados en la superficie (p. ej., la proteína GP del virus del Ébola) para inducir una respuesta inmune de base humoral. Típicamente, una respuesta inmune de base celular no se produce con las vacunas del tipo de virus muertos, debido a que estos viriones no acceden, por lo general, al interior de las células.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión polipéptido o proteína o virión o porción biológicamente activa o construcción de vacuna de la misma "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos a partir de la cual se obtiene el polipéptido (p. ej., GP del virus del Ébola).

Tal como se utiliza en esta memoria, "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición, permite que el ingrediente conserve actividad biológica y sin provocar reacciones perjudiciales con el sistema inmune del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a cualquiera de los soportes farmacéuticos estándares tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes ilustrativos para aerosol o administración parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (al 0,9%). Composiciones que comprenden este tipo de soportes se formulan por métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Capítulo 43, 14ª ed., Mack Publishing Co., Easton Pa 18042, EE.UU.). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en una diversidad de publicaciones, que incluyen, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" 20ª edición, Lippincott, Williams, y Wilkins; Remington's Pharmaceutical Sciences, 14ª ed. o la última edición, Mack Publishing Co., Easton Pa 18042, EE.UU.; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al, comps, 7ª ed, Lippincott, Williams, y Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., comps., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. En esta memoria se proporciona una discusión adicional.

La presente divulgación contempla que se pueda utilizar cualquier genoma del virus de la rabia adecuado o vector para construir las vacunas recombinantes de la invención. Así, el genoma del virus de la rabia puede obtenerse de cualquier cepa adecuada o aislado del virus de la rabia, siempre que esté o se haga para ser atenuado. Para los fines de esta invención, el término "atenuado", dado que pertenece a una propiedad de un genoma del virus de la rabia de la invención, debe dar a entender que el genoma o vector del virus de la rabia es capaz de una fijación, entrada, y en algunos casos, replicación viral en una célula huésped. Sin embargo, genomas del virus de la rabia atenuado - en comparación con genomas del virus de la rabia no atenuado o genomas del virus de la rabia - han perdido sustancial o completamente la propiedad de la neurovirulencia. En otras palabras, el carácter neurotrópico de los RVs atenuados de la invención preferiblemente se han suprimido o se han suprimido sustancialmente de tal manera que los vectores de RV de la invención son seguros para la administración a un sujeto o animal sin una preocupación sustancial para los efectos de neurovirulencia.

La biología básica del virus de la rabia es bien conocida. El virus de la rabia es un virus de ARN de cadena negativa, no segmentado, de la familia Rhabdoviridae, y que es el agente causante de la rabia. La rabia es una enfermedad que puede producirse en todas las especies de sangre caliente. La infección por el virus de la rabia, seguida por el estallido de las características clínicas en casi todos los casos tiene como resultado la muerte de las especies infectadas. En Europa, los EE.UU. y Canadá todavía existe la rabia en la vida salvaje y es un factor importante en la causa de la mayoría de los casos de rabia que se producen en seres humanos. Por otro lado, la rabia urbana constituye la principal causa de la rabia humana en los países en desarrollo y de continentes enteros tal como África.

Los viriones del virus de la rabia (RV) se componen de dos componentes estructurales principales: una nucleocápside o ribonucleoproteína (RNP), y una envoltura en forma de una membrana bicapa que rodea el núcleo de la RNP. El componente infeccioso de todos los Rhabdovirus es el núcleo de la RNP que consiste en el genoma de ARN encapsidado por la proteína de la nucleocápside (N) en combinación con dos proteínas de menor importancia, es decir, ARN polimerasa ARN dependiente (L) y la fosfoproteína (P). La membrana que rodea el núcleo de RNP se compone de dos proteínas: una glicoproteína de la transmembrana (G) y una proteína de la matriz (M) situada en el sitio interno de la membrana.

La proteína G, a la que también se alude como proteína de espiga, es responsable de la fijación celular y de la fusión de la membrana en el RV y, además, es el objetivo principal para el sistema inmune del huésped. La región de aminoácido en la posición 330 a 340 (a la que se alude como sitio antigénico III) de la proteína G se ha identificado como la responsable de la virulencia del virus, en particular, el residuo Arg en la posición 333. Todas las cepas de RV tienen en común esta virulencia determinante del sitio antigénico III.

Aunque el virus de la rabia de tipo salvaje casi siempre provoca una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) fatal en especies de mamíferos, la o las formas atenuadas de virus de la rabia normalmente no causan tales problemas.

El genoma o vectores del virus de la rabia atenuado adecuados se pueden encontrar descritos en otro lugar, por ejemplo en las Patentes de EE.UU. N°s.: 7.544.791; 7.419.816; 6.887.479; 6.719.981; y 6.706.523.

El genoma del virus de la rabia atenuado de la invención se puede basar en la cepa SAD B19 del virus de la rabia competente de la replicación, que es una cepa de RV que se ha utilizado para la inmunización oral de los animales salvajes en Europa durante más de 20 años y que tiene un buen historial de seguridad. La secuencia de nucleótidos de SAD B19 está disponible públicamente como Genbank N° de acceso M31046.1.

La divulgación también se refiere al polipéptido de filovirus de interés - y a sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos asociadas - cuyos genes se han de incorporar en los vectores de la rabia recombinantes atenuados. La divulgación contempla el uso de cualquier proteína de filovirus, incluida cualquier glicoproteína de superficie del virión, nucleoproteína, proteína estructural o elemento de la maquinaria de replicación, que se ha de incorporar utilizando técnicas estándares y bien conocidas en la biología molecular en los genomas del virus de la rabia atenuados. Las proteínas de filovirus pueden ser las identificadas del virus del Ébola (p. ej., de cualquiera de virus del Ébola Zaire, virus del Ébola Sudán, virus del Ébola Costa de Marfil o virus del Ébola Reston), incluyendo cualquiera de las siete proteínas del virus del Ébola codificadas, es decir, glicoproteína (GP) anclada a membrana, nucleoproteína (NP), una ARN polimerasa ARN dependiente (L) y cuatro proteínas estructurales del virión (VP24, VP30, VP35 y VP40).

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes para estas proteínas del virus del Ébola, así como correspondientes proteínas estructurales y no estructurales del virus de Marburg, están fácilmente disponibles en la técnica y se pueden utilizar fácilmente. Por consiguiente, la siguiente Tabla 1 proporciona información pertinente en relación con una lista no exhaustiva de secuencias públicamente disponibles contempladas por la presente divulgación, en particular con respecto a la glicoproteína del virus del Ébola:

Tabla 1

Proteína del filovirus	Género del filovirus	Especie (o subtipo)	Cepa	Genbank N° Secuencia(s) de nucleótidos	AA SEQ ID NO:
Glicoproteína (GP)	Virus del Ébola	Zaire	Mayinga	AY142960	SEQ ID NO: 1
Glicoproteína (GP)	Virus del Ébola	Sudán	Boniface	FJ968794.1	SEQ ID NO: 2
Glicoproteína (GP)	Virus del Ébola	Costa de Marfil	--	FJ217162.1	SEQ ID NO: 3
Glicoproteína (GP)	Virus del Ébola	Reston	Pennsylvania	AF522874.1	SEQ ID NO: 4
Glicoproteína (GP)	Virus del Ébola	Bundibugyo	--	FJ217161.1	SEQ ID NO: 5
Glicoproteína (GP)	Virus de Marburg	Marburg	Musoke	NC_001608.3	SEQ ID NO: 6

- 5 La divulgación contempla, además, que la vacuna de la rabia se puede manipular - utilizando técnicas bien conocidas - para expresar no sólo una glicoproteína del virus del Ébola, sino también para expresar una o más proteínas de filovirus adicionales (p. ej., proteínas del virus del Ébola o del virus de Marburg adicionales). De esta manera, es posible el uso de un vector del virus de la rabia atenuado bivalente o multivalente. Otras proteínas de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a las de la siguiente Tabla 2:

10 Tabla 2

Proteína del filovirus	Género del filovirus	Especie (o subtipo)	Cepa	Genbank N° Secuencia(s) de nucleótidos	AA SEQ ID NO:
Nucleoproteína (NP), VP24, VP30, VP35, VP40 y ARN polimerasa ARN dependiente (L)	Virus del Ébola	Zaire	Mayinga	AY142960	NP(SEQ ID NO: 7) VP24(SEQ ID NO: 8) VP30(SEQ ID NO: 9) VP35(SEQ ID NO: 10) VP40(SEQ ID NO: 11) L(SEQ ID NO: 12)
Nucleoproteína (NP), VP24, VP30, VP35, VP40 y ARN polimerasa ARN dependiente (L)	Virus del Ébola	Sudán	Boniface	FJ968794.1	NP(SEQ ID NO: 13) VP24(SEQ ID NO: 14) VP30(SEQ ID NO: 15) VP35(SEQ ID NO: 16) VP40(SEQ ID NO: 17) L(SEQ ID NO: 18)
Nucleoproteína (NP), VP24, VP30, VP35, VP40 y ARN polimerasa ARN dependiente (L)	Virus del Ébola	Costa de Marfil	--	FJ217162.1	NP(SEQ ID NO: 19) VP24(SEQ ID NO: 20) VP30(SEQ ID NO: 21) VP35(SEQ ID NO: 22) VP40(SEQ ID NO: 23) L(SEQ ID NO: 24)
Nucleoproteína (NP), VP24, VP30, VP35, VP40 y ARN polimerasa ARN dependiente (L)	Virus del Ébola	Reston	Pennsylvania	AF522874.1	NP(SEQ ID NO: 25) VP24(SEQ ID NO: 26) VP30(SEQ ID NO: 27) VP35(SEQ ID NO: 28) VP40(SEQ ID NO: 29) L(SEQ ID NO: 30)
Nucleoproteína (NP), VP24, VP30, VP35, VP40 y ARN polimerasa ARN dependiente (L)	Virus del Ébola	Bundibugyo	--	FJ217161.1	NP(SEQ ID NO: 31) VP24(SEQ ID NO: 32) VP30(SEQ ID NO: 33) VP35(SEQ ID NO: 34) VP40(SEQ ID NO: 35) L(SEQ ID NO: 36)
Nucleoproteína (NP), VP24, VP30, VP35, VP40 y ARN polimerasa ARN dependiente (L)	Virus de Marburg	Marburg	Musoke	NC_001608.3	NP(SEQ ID NO: 37) VP24(SEQ ID NO: 38) VP30(SEQ ID NO: 39) VP35(SEQ ID NO: 40) VP40(SEQ ID NO: 41) L(SEQ ID NO: 42)

Se entiende en la técnica que determinados cambios en la secuencia de nucleótidos empleada en una construcción genética tienen poca o ninguna relación con las proteínas codificadas por la construcción. Tales cambios son el resultado tanto de las mutaciones puntuales silenciosas o de mutaciones puntuales que codifican diferentes aminoácidos que no alteran apreciablemente el comportamiento de la proteína codificada. También se entiende que las porciones de la región codificadora pueden ser eliminadas sin afectar a la capacidad de la construcción de lograr el efecto deseado, a saber, la inducción de una respuesta inmune protectora contra una estimulación de filovirus. Se entiende, además, en la técnica que se pueden tomar determinadas medidas ventajosas para aumentar la antigenicidad de una proteína codificada por la modificación de su composición de aminoácidos. Tales cambios en la composición de aminoácidos pueden introducirse mediante la modificación de la secuencia genética que codifica la proteína.

Cualquier medio adecuado, incluyendo cualesquiera técnicas basadas en genética o basadas en biología molecular apropiadas, y similares se pueden utilizar para construir los vectores de la vacuna de la rabia recombinantes de la presente invención.

El experto en la materia puede obtener primero un vector del virus de la rabia adecuado para los propósitos de la invención. Preferiblemente, los vectores del virus de la rabia que son adecuados son aquellos que son atenuados de modo que no hay efectos perjudiciales por el vector del virus de la rabia sobre el sistema nervioso central cuando se utilizan para administrar a un sujeto. Vectores del virus de la rabia adecuados se pueden obtener fácilmente. Vectores de este tipo se pueden modificar para potenciar el grado de atenuación por métodos conocidos. Los autores de la presente invención utilizaron el vector de la vacuna BNSP RABV (Fig. 3), que se derivó de la cepa SAD B19 de la vacuna, que fue atenuada por el paso de cultivo de tejidos y que se ha utilizado previamente como una vacuna oral viva para la vida salvaje en Europa.

Esta construcción particular, tal como se discute en el Ejemplo 1 en esta memoria, se manipuló para que contuviera una nueva secuencia señal de la transcripción de parada y arranque RABV flanqueada por sitios de restricción *BsiW1* y *NheI* únicos entre los genes de nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) del genoma del virus de la rabia para la introducción de genes extraños. Además de ello, para eliminar completamente la neurovirulencia observada para esta construcción, se generó un derivado adicionalmente atenuado ("BNSP333"), que contiene un cambio de Arg→Glu en el aminoácido 333 de RABV G, que se ha demostrado atenúa en gran medida la neurovirulencia de vectores de la vacuna RABV en ratones adultos.

Tal como se discute con mayor detalle en los Ejemplos, los autores de la invención construyeron cuatro vacunas del virus de la rabia recombinante diferentes basadas en la vacuna del virus de la rabia atenuada BNSP333. Se generaron dos construcciones de BNSP333 que codifican la cepa Mayinga GP del virus del Ébola Zaire ("ZEBOV" aquí y a lo largo de la memoria) (véase la Fig. 3). BNSP333-GP codifica ZEBOV GP no modificada, mientras que BNSP333-GP_{GCD} codifica el ectodominio y el dominio de transmembrana GP fusionado al dominio citoplásmico G del virus de la rabia (GCD). La construcción fue generada para maximizar la probabilidad de que se produzca una incorporación eficiente de GP en viriones, lo cual puede ser importante para potenciales vacunas inactivadas en donde es importante la presentación de la superficie. Además, se prepararon dos construcciones adicionales que eran idénticas a las anteriores, pero el vector de BNSP333 portaba una delección en el gen G de la rabia. La proteína G de la rabia es la responsable de la unión y la entrada viral y un mediador importante de la neurovirulencia. Por lo tanto, la delección de G resulta en virus que están seriamente restringidos en el crecimiento y requieren una recuperación y una propagación con virus "helper" que proporcionan células huésped *trans*-complementarias que expresan el virus G de la rabia.

En la construcción de las construcciones de vectores de virus de la rabia descrita en esta memoria, un polipéptido inmunogénico de filovirus deseado (p. ej., glicoproteína del virus del Ébola) se puede seleccionar y obtener en base a las secuencias públicamente disponibles y con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas. Por ejemplo, una persona interesada en utilizar la vacuna del virus de la rabia para introducir la glicoproteína del virus del Ébola en un sujeto puede obtener la secuencia de nucleótidos del gen de la glicoproteína (GP) de la cepa Mayinga del virus del Ébola Zaire mediante la identificación de la tabla de arriba de Acceso a Genbank N° AY142960 utilizando información pública fácilmente disponible (p. ej., el sitio de datos operado por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología). Podría utilizarse una estrategia basada en PCR para amplificar el gen GP de una fuente adecuada de ADN de molde, también fácilmente obtenible por los expertos ordinarios en la técnica, utilizando cebadores de oligonucleótidos diseñados a partir de la propia secuencia del gen. Una vez amplificado, se podrían realizar métodos estándares para la clonación, verificación de la secuencia, expresión y transferencia de la secuencia de nucleótidos al vector de la rabia BNSP333 (o cualquier otro vector de la rabia adecuado de la invención) para obtener el vector del virus de la rabia recombinante deseado que expresa una glicoproteína (GP) de la cepa Mayinga del virus del Ébola Zaire. Resultará fácilmente evidente, sin embargo, que cualquier trabajo realizado utilizando secuencias o materiales del virus del Ébola o cualesquiera otros filovirus pueda necesitar ser realizado en laboratorios de Bioseguridad Nivel Tres (BSL3) o incluso BSL4 dados los evidentes peligros en el trabajo con y la manipulación de filovirus.

La divulgación contempla, además, introducir más de un solo inmunógeno de polipéptido de filovirus en el mismo vector del virus de la rabia recombinante. Por ejemplo, se podría, utilizando procesos similares a los ofrecidos anteriormente, así como cualesquiera otros procesos adecuados, preparar dos o más secuencias de nucleótidos que codifican diferentes inmunógenos de polipéptidos de filovirus de interés, p. ej., en donde un polipéptido de interés es la glicoproteína del virus del Ébola y un segundo polipéptido de interés es una proteína del virión del virus del Ébola NP, GP24, VP30, VP35 o VP40. Por lo tanto, la presente divulgación contempla el uso de un vector del virus de la rabia que contiene y expresa tanto una única glicoproteína del virus del Ébola como otro inmunógeno de polipéptido de filovirus.

Además de ello, dos o más diferentes construcciones de vacuna del virus de la rabia se pueden combinar en una administración única o a través de co-administración, en donde cada una de las vacunas del virus de la rabia está diseñada para expresar un polipéptido de inmunógeno de filovirus diferente.

Se contempla además que, en los casos en los que se produce reactividad cruzada, es decir, en los casos en los que anticuerpos o una respuesta citotóxica de células T inducida en respuesta a un virus del Ébola o a un polipéptido de filovirus puede ser de reactividad cruzada con el polipéptido correspondiente de un tipo diferente de virus del Ébola o incluso un género diferente de filovirus, la divulgación prevé una única vacuna que exprese un único polipéptido de filovirus (por ejemplo, GP de ZEBOV) que induce una respuesta inmune que es de reactividad cruzada contra otros tipos de virus del Ébola (p. ej., SEBOV, REBOV, BEBOV o CEBOV) o incluso otros filovirus (p. ej., virus de Marburg). Generalmente se sabe, sin embargo, que la GP del virus del Ébola no induce anticuerpos que son generalmente de reacción cruzada con GPs de otros tipos de virus del Ébola; por lo tanto, la divulgación también contempla composiciones de vacuna que comprenden los vectores de vacuna de la rabia recombinantes individuales que expresan una GP específica (o fragmentos inmunogénicos de la misma) a partir de subtipos específicos de virus del Ébola o incluso cepas específicas, de modo que se puede administrar una sola composición de vacuna eficaz contra una diversidad de agentes del virus del Ébola.

Estos y otros métodos para obtener y/o preparar las construcciones de vacuna del virus de la rabia se pueden encontrar, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. (comps.), John Wiley and Sons, Inc.

La invención contempla, además, que pueden utilizarse células huésped transfectadas por los vectores del virus de la rabia recombinantes de la invención para expresar la proteína codificada por virus y/o para formar viriones de la rabia recombinantes. Métodos y técnicas para mantener cultivos celulares continuos para la infección por virus de la rabia son bien conocidos en la técnica. Una línea de células puede ser infectada (o transfectada) con un vector de la vacuna de la rabia recombinante de la invención. Las líneas de células se pueden utilizar para expresar las proteínas virales, o se pueden utilizar para producir viriones de la rabia enteros que contienen el virus del Ébola expresado o el polipéptido del filovirus deseado de otro modo expresado a partir del vector de la vacuna de la rabia recombinante utilizado para infectar las células. Células huésped adecuadas pueden incluir cualquier célula susceptible de ser transfectada o infectada *in vitro* con una vacuna del virus de la rabia, incluyendo cualesquiera las líneas de células humanas o líneas de células animales. Tales líneas de células y su uso en la expresión de proteínas y la formación de viriones de la rabia son bien conocidos en la técnica y se describen con mayor detalle, por ejemplo, en Barrett PN et al., *Expert Rev Vaccines*, mayo de 2009; 8(5):607-18; Tordo N et al., *Dev Biol (Basel)*, 2008; 131:467-76; Toovey S. et al., *Travel Med Infect Dis*, noviembre de 2007; 5(6):327-48; Chelbi-Alix MK, *J Interferon Cytokine Res*, mayo de 2006; 26(5):271-80; Morenweiser R. et al., *Gene Ther*, octubre de 2005; 12 Supl 1:S103-10; Morimoto K et al., *Virus Res*, julio de 2005; 111(1):61-7. Epub 11 de abril de 2005; Finke S et al., *Virus Res*, agosto de 2005; 111(2):120-31; y Halder M., *Altern Lab Anim*, enero-febrero de 2002; 30(1):93-108; Montagnon BJ et al., *Dev Biol Stand*, 1998; 93:119-23.

Se prefiere que los virus de la vacuna de la rabia y la producción de cualesquiera viriones de virus y su uso como vacunas se realice de acuerdo con cualesquiera requisitos nacionales y/o internacionales de salud y seguridad necesarios en relación con el virus de la rabia y filovirus, p. ej., de acuerdo con los requisitos del Centro de Control de Enfermedades ("CDC") de EE.UU. o la Organización Mundial de la Salud ("OMS").

Las vacunas de vector del virus de la rabia recombinante de la invención, o las vacunas de viriones de la rabia recombinante (que expresan en o sobre ellas el polipéptido o los polipéptidos de filovirus deseados) se pueden formular como composiciones de acuerdo con métodos conocidos para la preparación de formulaciones medicinales y composiciones farmacéuticas. El tipo y los componentes de las composiciones farmacéuticas descritos en esta memoria pueden depender del modo de administración, p. ej., oral, parenteral o la piel.

Composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración oral pueden incluir polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobrecitos, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, coadyuvantes de dispersión o aglutinantes.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de la penetración, compuestos de soporte y otros soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria también pueden incluir, pero no se limitan a disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una diversidad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes.

- 10 Las formulaciones farmacéuticas descritas en esta memoria, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidos en la industria farmacéutica. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con soportes líquidos o soportes sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

- 15 Las composiciones farmacéuticas pueden incorporar compuestos de soporte en la formulación. Tal como se utiliza en esta memoria, "compuesto de soporte" o "soporte" puede referirse a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica per se) pero es reconocido como un ácido nucleico por procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o fomentando su retirada de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico tal como un vector de vacuna de la rabia de la invención, y un compuesto de soporte, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede resultar en una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros reservorios extra-circulatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto de soporte y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNds parcialmente fosforotioato en tejido hepático puede reducirse cuando se co-administra con ácido poliiinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., DsRNA Res. Dev, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183.

- 30 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir un "soporte farmacéutico" o "excipiente", el cual, para los propósitos de la invención, es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para la entrega de uno o más ácidos nucleicos (p. ej., un vector de virus de la rabia recombinante de la invención) o polipéptido o virión de virus (p. ej., un virión de la rabia recombinante que expresa la una o más glicoproteínas de filovirus de la invención) a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la manera planeada de administración en mente, para proporcionar la mayor parte deseada, consistencia, etc., cuando se combina con un agente activo de la invención (p. ej., vector de vacuna de la rabia, virión, o polipéptidos expresados) los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Soportes farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a agentes de unión (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa, etc.); cargas (p. ej., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrógeno-fosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (p. ej., almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (p. ej., lauril-sulfato de sodio, etc.).

- 40 Excipientes orgánicos o inorgánicos, farmacéuticamente aceptables, adecuados para la administración parenteral no que no reaccionan perjudicialmente con los agentes activos de la invención (p. ej., vector de vacuna de la rabia, virión o polipéptidos expresados) también se pueden utilizar para formular las composiciones descritas en esta memoria. Soportes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

- 50 Las composiciones farmacéuticas pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales y compatibles tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, materiales de este tipo, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no interactúan perjudicialmente con el o los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de otros agentes quimioterapéuticos adicionales, por ejemplo el fármaco antiviral de molécula pequeña inhibe algún aspecto de la entrada y/o la replicación y/o el ensamblaje del virus del Ébola, o que ayuda a mitigar uno o más síntomas de una infección por virus del Ébola, o una infección por otros filovirus tal como virus de Marburg. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos de este tipo incluyen, pero no se limitan a daunorubicina, daunomicina, dactinomina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, bis-cloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUDR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, en general, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª ed. 1987, págs. 1206-1228, Berkow et al., comps., Rahway, N.J. Cuando se utiliza con los compuestos descritos en esta memoria tales agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse individualmente (p. ej., 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (p. ej., 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más otros tales agentes quimioterapéuticos (p. ej., 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos anti-inflamatorios que incluyen, pero no se limitan a fármacos antiinflamatorios no esteroides y los corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones descritas en esta memoria. Véase, en general, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª ed., Berkow et al., comps., 1987, Rahway, N.J. páginas 2499-2506 y 46-49, respectivamente). También se contemplan otros agentes quimioterapéuticos. Dos o más compuestos combinados pueden utilizarse juntos o secuencialmente. Tales compuestos pueden administrarse usando un programa de administración separado en relación con el programa de administración de los agentes activos de la invención. Los programas de administración también pueden ser el mismo o pueden solaparse.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de este tipo de compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren compuestos que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de las composiciones se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método descrito en esta memoria, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto de polipéptido de una secuencia diana (p. ej., logrando una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Una información de este tipo se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, tal como se discutió anteriormente, las vacunas de la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes conocidos, eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión del virus del Ébola o por otro filovirus - tales como los enumerados arriba e igualmente otros. En cualquier caso, el médico encargado puede ajustar la cantidad y el momento de administración de la vacuna sobre la base de los resultados observados utilizando medidas estándares de eficacia conocidas en la técnica o descritas en esta memoria.

El uso de la presente divulgación contempla cualquier medio o método adecuado para administrar las composiciones de vacuna de la invención. El experto en la técnica apreciará que los medios de administración particulares pueden depender de si la composición de vacuna que comprende viriones del virus de la rabia recombinante (p. ej., con la glicoproteína expresada del virus del Ébola presentada en la superficie del virión) o si la vacuna que se ha administrar es una vacuna basada en ácido nucleico, es decir, en donde la vacuna comprende un vector del virus de la rabia recombinante de la invención que ha sido modificado para expresar una glicoproteína de filovirus (o un fragmento inmunogénico de la misma).

La administración de cualquiera de las vacunas de la invención en esta memoria puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante inyección parenteral (tal como inyección intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), inyección in ovo de aves, por vía oral o mediante aplicación tópica del virus (típicamente portado en una formulación farmacéutica) a una superficie de las vías respiratorias. La aplicación tópica de una vacuna de la invención a una superficie de las vías respiratorias puede llevarse a cabo por administración intranasal (p. ej., mediante el uso de gotero, torunda o inhalador que deposita una formulación farmacéutica por vía intranasal). La aplicación tópica de una vacuna de la invención a una superficie de las vías respiratorias también se puede llevar a cabo mediante administración por inhalación tal como mediante la creación de partículas respirables de una formulación farmacéutica (incluyendo tanto partículas sólidas como partículas líquidas) que contiene el replicón como una suspensión en aerosol, y luego haciendo que el sujeto inhale las partículas respirables. Métodos y aparatos para la administración de partículas respirables de formulaciones farmacéuticas son bien conocidos, y se puede emplear cualquier técnica convencional. La administración por vía oral puede ser en forma de una formulación líquida o sólida ingerible. Tal como se señaló arriba, un ejemplo particular es la inyección subcutánea, y otro es la inyección intramuscular.

Cuando la vacuna de la invención es ARN o ADN (p. ej., un vector de vacuna del virus de la rabia recombinante que expresa una glicoproteína de filovirus, p. ej., la glicoproteína del virus del Ébola), el vector de vacuna de ARN o ADN se puede administrar directamente utilizando técnicas tales como la entrega en perlas de oro (pistola de genes), la entrega mediante liposomas o por inyección directa, entre otros métodos conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Cualquiera de una o más construcciones de nucleótidos arriba descritas se puede utilizar en cualquier combinación eficaz para provocar una respuesta inmunogénica en un sujeto. Generalmente, la vacuna de ácidos nucleicos puede ser administrada en una cantidad de aproximadamente 1-5 µg de ácido nucleico por dosis y dependerá del sujeto a tratar, de la capacidad del sistema inmune del sujeto de desarrollar la respuesta inmune deseada, y del grado de protección deseado. Las cantidades precisas de la vacuna a administrar pueden depender de la opinión del médico y pueden ser peculiares para cada uno de los sujetos y antígenos.

También se pueden utilizar sistemas de suministro de microesferas basadas en lípidos para entregar las vacunas de la invención, en particular las moléculas de vector de vacuna de la invención. Opcionalmente, tales sistemas pueden ser modificados de tal manera que fijan específicamente como objetivo células y/o tejidos y/u órganos específicos del cuerpo, p. ej., sitios de infección. Métodos para preparar tales sistemas serán bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Por ejemplo, microesferas de este tipo de suministro vectores pueden modificarse para que comprendan uno o más ligandos o restos fijadores de objetivo que permiten que la microesfera se una y/o interactúe específicamente con un receptor u otra diana en una célula o tejido diana.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones de vectores de la rabia recombinantes constituidas por un sistema de soporte basado en lípidos tal como una partícula de ácido nucleico-lípidos estabilizada, complejos de lípidos catiónicos o lípidos catiónicos o ácidos nucleicos de liposomas (es decir, lipoplejos), un liposoma, una micela, un virosoma o una mezcla de los mismos, que pueden estar opcionalmente modificados para que contengan un resto que permite que sea fijado como objetivo a una o más células o tejidos del tracto gastrointestinal. El sistema de soporte puede ser un sistema de soporte basado en polímeros tal como un complejo catiónico de polímero-ácido nucleico (es decir, un poliplejo), que puede estar opcionalmente modificado para que contenga un resto que le permite ser fijado como objetivo a una o más células o tejidos deseados. El sistema de soporte puede ser un sistema de soporte basado en ciclodextrina tal como un complejo de polímero de ciclodextrina-ácido nucleico, que puede estar opcionalmente modificado para que contenga un resto que le permita ser fijado como objetivo a una o más células o tejidos deseados. El sistema de soporte puede ser un sistema de soporte basado en proteínas tal como un complejo catiónico de péptido-ácido nucleico. Partículas de ácido nucleico-lípido y/o de proteína-lípido y su método de preparación se describen, p. ej., en las patentes de EE.UU. N°s 5.753.613; 5.785.992; 5.705.385; 5.976.567; 5.981.501; 6.110.745; y 6.320.017; y la publicación PCT N° WO 96/40964.

Los lipoplejos pueden incluir lípidos no catiónicos utilizados en las formulaciones descritas en esta memoria, que incluyen cualquiera de una diversidad de lípidos no cargados, de iones híbridos o aniónicos neutros, capaces de producir un complejo estable. Tales lípidos no catiónicos pueden ser de carga neutra o negativa. Ejemplos de lípidos no catiónicos incluyen, sin limitación, materiales relacionados con fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrosidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipanitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE) y estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE).

Lípidos no catiónicos o esteroides tales como colesterol también pueden estar presentes en este tipo de microesferas. Lípidos sin fósforo adicionales incluyen, p. ej., estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfóteros, lauril-sulfato de trietanolamina, amidas de ácidos grasos de alquil-aril-sulfato polietoxiladas, bromuro de dioctadecildimetil-amonio, ceramida, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina y similares. Pueden estar presentes otros lípidos, tales como lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. Lípidos no catiónicos también incluyen polímeros basados en polietilenglicol (PEG) tales como PEG 2000, PEG 5000, y polietilenglicol conjugado a fosfolípidos o a ceramidas (a los que se alude como PEG-Cer), según se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie. 08/316.429.

Ejemplos no limitantes de los sistemas de soporte adicionales basados en lípidos, adecuados para uso en la presente invención, incluyen lipoplejos (véase, p. ej., publicación de Patente de EE.UU. N° 20030203865; y Zhang et al, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004), lipoplejos sensibles al pH (véase, p. ej., publicación de Patente de EE.UU. N° 2002/0192275) lipoplejos reversiblemente enmascarados (véase, p. ej., publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0180950), composiciones basadas en lípidos catiónicas (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 6.756.054; y la publicación de Patente de EE.UU. N° 2005/0234232), liposomas catiónicos (véase, p. ej., las publicaciones de Patente de EE.UU. N° 2003/0229040, 2002/0160038 y 2002/0012998; Patente de EE.UU. N° 5.908.635; y la publicación PCT N° WO 01/72283), liposomas aniónicos (véase, p. ej., la publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0026831), liposomas sensibles al pH (véase, p. ej., la publicación de Patente de EE.UU. N° 2002/0192274; y documento AU 2003/210303), liposomas revestidos con anticuerpos (véase, p. ej., la publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0108597, y la publicación PCT N° WO 00/50008), los liposomas específicos para el tipo de célula (véase, p. ej., la publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0198664), liposomas que contienen ácido nucleico y péptidos (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 6.207.456), liposomas que contienen lípidos derivatizados con polímeros hidrófilos liberables (véase, p. ej., la publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0031704), ácido nucleico atrapado en lípidos (véanse, p. ej., las publicaciones PCT N°s WO 03/057190 y WO 03/059322), ácido nucleico encapsulado en lípidos (véase, p. ej., la publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0129221; y la patente de EE.UU. N° 5.756.122), otras composiciones de liposomas (véanse, por ejemplo, las publicaciones de Patente de EE.UU. N°s 2003/0035829 y 2003/0072794; y la patente de EE.UU. N° 6.200.599), mezclas estabilizadas de liposomas y emulsiones (véase, p. ej., el documento EP1304160), composiciones en emulsión (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 6.747.014), y micro-emulsiones de ácidos nucleicos (véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0037086).

La administración puede ser por el suministro de genes acelerado en partículas.

La técnica del suministro de genes acelerado en partículas se basa en el revestimiento de construcciones genéticas a ser entregado a células sobre partículas de soporte extremadamente pequeñas, que están diseñadas para ser pequeñas en relación con las células buscadas para ser transformadas por el procedimiento. Las partículas de soporte revestidas son entonces aceleradas físicamente hacia las células para ser transformadas de manera que el soporte de partículas se aloje en el interior de las células diana. Esta técnica se puede utilizar ya sea con células in vitro o in vivo. Con cierta frecuencia, el ADN que ha sido revestido previamente sobre las partículas de soporte se expresa en las células diana. Esta técnica de expresión génica ha demostrado funcionar en procariotas y eucariotas, desde bacterias y levaduras hasta plantas superiores y animales. Así, el método de partículas aceleradas proporciona una metodología conveniente para suministrar genes a las células de una amplia diversidad de tipos de tejidos y ofrece la capacidad de suministrar esos genes a células in situ e in vivo sin ningún impacto o efecto adverso en el individuo tratado. Por lo tanto, también se prefiere el método de partículas aceleradas, debido a que permite una construcción de vacuna genética capaz de provocar una respuesta inmune a ser dirigida tanto a un tejido particular como a una capa de células particular en un tejido, variando el sitio de suministro y la fuerza con la que las partículas se aceleran, respectivamente. Esta técnica es, por lo tanto, particularmente adecuada para el suministro de genes para las proteínas antigénicas en la epidermis.

Por lo tanto, con respecto al suministro de los vectores de vacuna de la rabia recombinantes de la invención, gotitas acuosas que contienen vector desnudo se pueden suministrar por técnicas de aceleración adecuadas a los tejidos del individuo objeto de ser vacunado. Con cierta frecuencia, dicho material de vector "desnudo" se recogerá en los tejidos tratados.

El enfoque general de la tecnología de transfección génica con partículas aceleradas está descrito en la patente de EE.UU. N° 4.945.050. Un instrumento basado en una variante mejorada de ese enfoque está disponible comercialmente en BioRad Laboratories. Un enfoque alternativo a un aparato de transfección con partículas aceleradas está descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.015.580 que, aunque dirigida a la transfección de plantas de soja, describe un aparato que es igualmente adaptable para uso con células de mamíferos y mamíferos enteros intactos. La patente de EE.UU. N° 5.149.655 describe una cómoda versión de mano de un dispositivo de suministro de genes con partículas aceleradas. Otros de estos dispositivos pueden basarse en otras fuentes de propulsión utilizando, por ejemplo, gas comprimido como fuerza motriz. Un aparato y un método preferidos para suministrar material genético, descritos en esta memoria, se describen en la solicitud de patente PCT publicada PCT/US95/00780 y en la patente de EE.UU. N° 5.584.807 que será expedida el 17 de diciembre de 1996.

Una "vacuna genética", es decir, un vector de vacuna de la rabia recombinante (en contraposición a una composición de viriones de la rabia, que también se contemplan en esta memoria) se puede suministrar de una manera no invasiva a una diversidad de tipos de tejidos susceptibles a fin de lograr la respuesta antigénica deseada en el individuo. Lo más ventajosamente, la vacuna genética puede ser introducida en la epidermis. Se ha encontrado

5 que un suministro de este tipo producirá una respuesta sistémica humoral inmune, una respuesta de memoria y una respuesta inmune citotóxica. Cuando se suministra una vacuna genética a células de la piel, se pensó que era deseable eliminar o perforar el estrato córneo.

Para obtener una eficacia adicional de esta técnica, también puede ser deseable que los genes sean entregados a una superficie del tejido de la mucosa, con el fin de asegurar que las respuestas inmunes mucosales, humorales y

10 celulares se produzcan en el individuo vacunado. Se contempla que hay una diversidad de sitios de administración adecuados disponibles, incluyendo cualquier número de sitios sobre la epidermis, células de la sangre periférica, es decir, linfocitos, que podrían ser tratados in vitro y se colocan de nuevo en el individuo, y una diversidad de superficies orales, del tracto respiratorio superior y de las mucosas genitales.

El término "transfectado" se utiliza en esta memoria para referirse a células que han incorporado la construcción de vacuna genética extraña suministrada (p. ej., los vectores de vacuna de la rabia recombinantes), cualquiera que sea la técnica de suministro utilizada. El término transfección se utiliza con preferencia al término "transformación" para

15 evitar la ambigüedad inherente a este último término, que también se utiliza para referirse a cambios celulares en el proceso de la oncogénesis. El término "infección" pertenece al proceso de absorción celular molecular normal por el cual un virus se introduce en una célula. Se dice a veces que células de este tipo "susceptibles" a la infección.

Al inducir respuestas inmunes celulares, humorales y protectoras después de la vacunación genética, las células diana preferidas son células epidérmicas, en lugar de células de las capas de piel más profundas tales como la dermis. Las células epidérmicas son receptores preferidos de vacunas genéticas, ya que son las células más accesibles del cuerpo y pueden, por lo tanto, ser inmunizadas de forma no invasiva. En segundo lugar, además de

20 provocar una respuesta inmune humoral, las células epidérmicas genéticamente inmunizadas también provocan una respuesta inmune citotóxica que es más fuerte que la generada en las células subepidérmicas. El suministro a la epidermis también tiene las ventajas de ser menos invasivo y de suministrar células que son desprendidas en última instancia por el cuerpo.

La administración de las vacunas de la presente invención (p. ej., los viriones de la rabia recombinantes y/o los vectores de vacuna de la rabia recombinantes de la invención) por cualquiera de los medios descritos anteriormente

30 puede estar de acuerdo con cualquier programa de vacunación adecuado, p. ej., día 0, un mes, cuatro meses y doce meses a contar desde el día 0. Sin embargo, en términos generales, las vacunas descritas en esta memoria podrán también administrarse en un programa de dosis única, o preferiblemente un programa de dosis múltiple en el que un curso primario de vacunación puede ser con 1-10 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores, requeridas para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, a los 1-4

35 meses para una segunda dosis y, si es necesario, una o más dosis subsiguientes después de varios meses. Otros ejemplos de programas de inmunización adecuados incluyen: (i) 0, 1 mes y 6 meses, (ii) 0, 7 días y 1 mes, (iii) 0 y 1 mes, (iv) 0 y 6 meses, (v) 0, 1 y 2 meses, u otros programas suficientes para provocar las respuestas inmunes deseadas que se espera confieran inmunidad protectora, o reduzcan los síntomas de la enfermedad, o reduzcan la gravedad de la enfermedad.

Se describen en esta memoria métodos para evaluar una muestra en cuanto a la presencia de anticuerpos producidos contra la rabia y/o un filovirus, p. ej., un virus del Ébola. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para evaluar si una muestra de tejido contiene anticuerpos contra el virus del Ébola, otro filovirus o la rabia, que

40 puede ser útil en la detección de si una persona o animal fue expuesto a este tipo de patógenos. Tales métodos de detección también pueden ser útiles en el seguimiento de la sangre o de otros tejidos de un sujeto en cuanto a la evidencia de que una respuesta inmune haya sido inducida contra una vacuna de la invención.

Se describe en esta memoria un método para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus del Ébola en una muestra. Utilizando una metodología estándar bien conocida en la técnica, se puede construir un ensayo de diagnóstico mediante el revestimiento sobre una superficie (es decir, un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación, una membrana (p. ej. membrana de nitrocelulosa) o una varilla de nivel), la totalidad o una porción

50 única de cualquiera de las proteínas del virus del Ébola descritas anteriormente o cualquier combinación de las mismas, y poniéndolo en contacto con el suero de una persona o animal sospechoso de tener el virus del Ébola. La presencia de un complejo resultante formado entre la o las proteínas del virus del Ébola y anticuerpos séricos específicos para el mismo puede ser detectada por cualquiera de los métodos conocidos comunes en la técnica tales como espectroscopia de anticuerpos fluorescentes o colorimetría. Este método de detección se puede utilizar,

55 por ejemplo, para el diagnóstico de una infección por el virus del Ébola y para determinar el grado al que un individuo ha desarrollado anticuerpos específicos para el virus después de la administración de una vacuna.

Se describen en esta memoria métodos para detectar la presencia de proteínas del virión de la rabia, un filovirus o virus del Ébola en una muestra. Anticuerpos contra las proteínas GP, NP y VP podrían utilizarse para ensayos de

- 5 diagnóstico. Utilizando la metodología estándar bien conocida en la técnica, se puede construir un ensayo de diagnóstico por revestimiento sobre una superficie (es decir, un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o una membrana (por ejemplo membrana de nitrocelulosa)), anticuerpos específicos para cualquiera de las proteínas del virus del Ébola descritas anteriormente, y poniéndolos en contacto con suero o una muestra de tejido de una persona sospechosa de tener una infección por el virus del Ébola. La presencia de un complejo resultante formado entre la proteína o proteínas en el suero y los anticuerpos específicos para las mismas puede ser detectada por cualquiera de los métodos conocidos comunes en la técnica tales como espectroscopia de anticuerpos fluorescentes o colorimetría. Este método de detección se puede utilizar, por ejemplo, para el diagnóstico de una infección por el virus del Ébola.
- 10 Se describen en esta memoria secuencias de ADN o de nucleótidos para su uso en la detección de la presencia de virus de la rabia o filovirus, p. ej., el virus del Ébola, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o por algún otro medio adecuado para la detección de secuencias de nucleótidos específicas. La secuencia de nucleótidos descrita en esta memoria se puede utilizar para diseñar cebadores que se unen específicamente al ARN viral con el fin de detectar la presencia del virus del Ébola o para medir la cantidad de virus del Ébola en una muestra. Los cebadores pueden ser de cualquier longitud que oscile entre 7 y 400 nucleótidos, preferiblemente al menos 10 a 15 nucleótidos, o más preferiblemente 18 a 40 nucleótidos. Los reactivos y controles necesarios para las reacciones PCR son bien conocidos en la técnica. Los productos amplificados pueden ser entonces analizados en cuanto a la presencia de secuencias virales, por ejemplo mediante fraccionamiento en gel, con o sin hibridación, por radioquímica, y técnicas de inmunoquímica, u otras técnicas adecuadas.
- 15 Se describe en esta memoria un kit de diagnóstico que contiene una composición de vacuna de la invención, y opcionalmente medios para detectar si se induce una respuesta inmune tras la administración de la vacuna, y además, opcionalmente, medios para administrar la vacuna de la invención, y aún más, opcionalmente, un conjunto de instrucciones que indican un procedimiento para la administración de la vacuna y la evaluación de su eficacia en la respuesta inmune.
- 20 Dependiendo de cómo se haga funcionar el kit, el kit también puede incluir una o más composiciones de vacuna adicionales, en donde cada una de las composiciones de vacuna comprende un vector de virus de la rabia recombinante que expresa una proteína de filovirus diferente (o un fragmento inmunogénico de la misma), p. ej., una glicoproteína del virus del Ébola o un fragmento inmunogénico de la misma.
- 30 Se apreciará que determinados componentes de los kits pueden variar dependiendo de qué sujeto esté siendo vacunado y/o de cuales de los mismos se hayan de tomar muestras. Determinados sujetos pueden incluir, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, animales, p. ej., caballo, burro, cerdo, ratón, hámster, mono, u otros mamíferos, aves. Por ejemplo, cuando un vector de vacuna de la rabia se ha de administrar a un ser humano, el kit puede incluir una ruta de la piel, mientras que en los casos en los que la administración es a un primate no humano, el kit puede incluir en su lugar una jeringa.
- 35 Los kits pueden incluir también un reactivo de inmunodetección o etiqueta para la detección de los anticuerpos inducidos por la vacunación o para detectar muestras en cuanto a la presencia de péptidos de la rabia o de filovirus. Reactivos de detección adecuados son bien conocidos en la técnica según se ejemplifica mediante ligandos radiactivos, enzimáticos o cromogénicos de otro tipo, que se emplean típicamente en asociación con el antígeno y/o anticuerpo, o en asociación con un segundo anticuerpo que tiene especificidad para el primer anticuerpo. Por lo tanto, la reacción se detecta o cuantifica por medio de detectar o cuantificar la etiqueta. Reactivos de inmunodetección y procesos adecuados para la aplicación en relación con los nuevos métodos descritos en esta memoria son generalmente bien conocidos en la técnica.
- 40 Los reactivos también pueden incluir agentes auxiliares tales como agentes tampón y agentes estabilizantes de proteínas, p. ej., polisacáridos y similares. El kit puede incluir además, cuando sea necesario, agentes para reducir la interferencia de fondo en un ensayo, agentes para aumentar la señal, un aparato para realizar un ensayo, curvas y tablas de calibración, curvas y gráficos de normalización, y similares.
- 45 Un kit de este tipo puede comprender instrucciones para parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o inserción separada.
- 50 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los autores de la invención y que se cree que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

EJEMPLOS

Los materiales, composiciones y métodos descritos en esta memoria están destinados a ser ejemplos representativos de la invención, y se entenderá que el alcance de la invención no está limitado por el alcance de los ejemplos. Los expertos en la técnica reconocerán que la invención puede ponerse en práctica con variaciones en los materiales, composiciones y métodos descritos.

- 5 El objetivo colectivo de estos Ejemplos era identificar nuevos candidatos de vacunas para el EBOV con un potencial máximo de acreditación y utilización. Para este fin, se eligió la plataforma de vacuna del virus de la rabia (RABV). Esta plataforma permitirá el rápido desarrollo de candidatos de vacunas competentes en la replicación, deficientes en la replicación, y químicamente inactivados para aumentar la probabilidad de que se pueda lograr un equilibrio adecuado entre la inmunogenicidad y reactogenicidad de la vacuna.
- 10 El RABV es un virus de ARN no segmentado, de sentido negativo, de la familia *Rhabdoviridae*. Aunque el RABV de tipo salvaje casi siempre causa una enfermedad del SNC fatal en especies de mamíferos (Schnell et al, 2010), en su forma atenuada, la vacuna del RABV no causa una enfermedad del SNC fatal (Cenna et al, 2008; Faber et al, 2005; Faul et al, 2009; Faul et al, 2008; McGettigan et al, 2006; McGettigan et al, 2003a; McGettigan et al., 2003b; Siler et al., 2002; Snook et al., 2008; Tan et al., 2005). Los vectores de vacunas del RABV se pueden generar a partir de un sistema genético inverso derivado de la vacuna SAD B19 RABV viva atenuada que se utiliza para la vacunación de la vida salvaje en Europa (Vos et al., 1999; Vos et al., 2002). Se han generado vacunas vectorizadas del RABV adicionalmente atenuadas mediante la introducción de mutaciones en la glicoproteína (G) del RABV, así como la delección de la G del RABV que se propaga en líneas de células trans-complementarias que expresan la G del RABV (Gomme et al., 2010 ; McGettigan et al, 2003b; McKenna et al, 2004). Se ha demostrado que estos virus recombinantes son deficientes o están restringidos en el crecimiento *in vitro* e *in vivo* y son fuertemente inmunogénicos (Gomme et al, 2010; McGettigan et al, 2003b; McKenna et al, 2004). Por otra parte, se ha utilizado la inactivación mediada por beta-propiolactona de vacunas vectorizadas del RABV para generar candidatos de vacunas muertos que deben tener perfiles de seguridad óptimos (Siler et al., 2002; Smith et al., 2006).
- 25 Los Ejemplos que siguen describen la generación de vacunas del RABV vivas atenuadas e inactivadas que expresan la GP de ZEBOV y que demuestran sus propiedades moleculares, virulencia, inmunogenicidad y eficacia protectora contra el RABV y el EBOV en ratones. Además de las ventajas de la plataforma de vacuna del RABV arriba descrita, se prevé que el actual estado avanzado de seguridad, producción y distribución de la vacuna del RABV puede facilitar el desarrollo clínico de estas vacunas del GP de ZEBOV. Además, RABV provoca 24.000 muertes estimadas al año en África, con lo que una vacuna bivalente RABV/EBOV sería una herramienta eficaz de la salud pública en África Central.
- 30

EJEMPLO 1. Métodos y Materiales Utilizados a lo Largo de los Ejemplos

- GP del virus del Ébola Zaire (ZEBOV).** Tal como se utiliza en estos Ejemplos, la referencia a GP de ZEBOV se basa en la región codificadora de longitud completa que codifica la GP del virus del Ébola que comienza en el nucleótido 6039 y que se extiende hasta el nucleótido 8068 de la secuencia de nucleótidos identificada como GenBank N° de acceso AY142960.1 (virus del Ébola subtipo Zaire, cepa Mayinga).
- 35

Construcción de plásmidos. La región codificadora de longitud completa de la GP del virus del Ébola Zaire (ZEBOV) se amplificó con los cebadores RP777

(GTGTGAATCCGGAACGTACGCCGCCACCATGGGTGTTACAGGAATATTG CA GTTACCTCGT SEQ ID NO: 47) y RP778

- 40 (GGAAGCTAGCTCACTAAAAGAC AAATTTGCATATACAGAATAAAGC SEQ ID NO: 48) y se clonó en los sitios *Bs*WI y *Nhe*I de un vector RV de BNSP modificado, que codifica ácido glutámico en la posición 333 de la glicoproteína del RABV (McGettigan et al 2003). El plásmido resultante se designó cBNSP333-GP. Una versión truncada de la GP que contiene los dominios ecto y de transmembrana, pero carece de la cola citoplásmica, se amplificó con los cebadores RP777 y RP781 (GGAA GCTAGC CTA GTT AAC GCA TAT ACA GAA TAA AGC GAT AAC TGC AA SEQ ID NO: 49), se digirió con *Bs*WI y *Hpa*I y se ligó al fragmento *Hpa*I-*Nhe*I de pSN- VSV-G (Foley et al, 2000), que contiene la cola citoplásmica de la G del RABV. El gen de fusión se digirió entonces con *Bs*WI y *Nhe*I y se clonó en cBNSP333 para generar cBNSP-GP_{GCD}. Las construcciones G-suprimidas BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD} fueron generadas mediante la digestión de los plásmidos parentales que contienen G BNSP-GP y BNSP-GP_{GCD} con *Pac*I y *Sma*I y religación de los fragmentos romos.
- 45
- 50 **Recuperación de virus a partir de ADNc y propagación.** RABV recombinante con contenido en G y deficiente en G se recuperaron y se hicieron crecer como se ha descrito previamente (Gomme et al, 2011; Wirblich y Schnell, 2010).

Transferencia Western. Células BSR se infectaron a una MOI de 2-5 a 34°C. A las 24, 48 y 72 h después de la infección, las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4],

NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, dodecil-sulfato de sodio [SDS] al 0,1%, cóctel de inhibidor de proteasa 1x [Sigma]) en hielo durante 30 min. La suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó durante 10 min a 16.000 g para eliminar los desechos celulares. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 9% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Minnetonka, Minn.). Los borrones se bloquearon durante 1 h en leche seca en polvo al 5% en TBS [pH 7,4]. Después de haber sido bloqueados, los borrones se lavaron dos veces utilizando una disolución de TBS-Tween 20 al 0,05% y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo anti-EBOV policlonal de mono o anticuerpo monoclonal contra la fosfoproteína del RABV. Los borrones se lavaron después cuatro veces con TBS-Tween al 0,1%. Se añadieron anticuerpos secundarios anti-humanos de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (diluidos 1: 50.000) (Jackson ImmunoResearch), y los borrones se incubaron durante 1 h a TA. Los borrones se lavaron cuatro veces con BS-Tween al 0,1% y se lavaron una vez con PBS (pH 7,4). Se realizó un análisis de quimioluminiscencia utilizando sustrato WestPico (PIERCE) según las instrucciones del proveedor.

Microscopía electrónica. Células BSR se cultivaron en DMEM (Gibco) suplementado con FBS al 5% (Hyclone) y penicilina/estreptomicina al 1% durante 24 h. Las monocapas se lavaron una vez con 1X PBS, y después se infectaron con virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 en medio cellgro Complete libre de suero (Mediatech). Los matraces se incubaron a 37°C/5% de CO₂ durante 72-96 h. Para el marcaje doble con inmuno-oro, las células infectadas se fijaron en sus matraces respectivos durante diez minutos en paraformaldehído al 0,1% en tampón de Millonig. Las células se incubaron con el anticuerpo GP anti-virus del Ébola humano KZ52 durante tres horas, a temperatura ambiente. Después de etapas de lavado con medio Cellgro Complete Media (Mediatech Inc., Mannassas, VA), las células se incubaron con oro coloidal de 5 nm anti-humano de cabra (Ted Pella, Redding, CA) durante dos horas, a temperatura ambiente. Después de etapas de lavado, las células fueron incubadas con anticuerpo G anti-rabia de conejo (Jackson Immuno, West Grove, PA) durante tres horas, a temperatura ambiente. Después de etapas de lavado, las células fueron incubadas con oro coloidal de 15 nm anti-conejo de cabra durante dos horas, a temperatura ambiente. Después de etapas de lavado, las células se fijaron utilizando glutaraldehído al 2,5%, paraformaldehído al 2,0%, en tampón fosfato de sodio de Millonig (Tousimis Research, Rockville, MD). Después de raspar y de granular, las muestras se lavaron repetidamente en tampón de Millonig, y se incubaron durante dos horas en tetróxido de osmio al 1,0%, en el mismo tampón. Después de etapas de enjuague en Water Ultrapure y de tinción en bloque con acetato de uranilo al 2,0%, las muestras se deshidrataron en una serie de etanoles graduados, y se infiltraron y embebieron en resina plástica DER-736. Los bloques embebidos se seccionaron utilizando un aparato Ultracut E Ultramicrotome de Reichert-Jung. Se recogieron secciones de 50-70 nanómetros en rejillas de cobre de malla 200, y se post-tiñeron con citrato de plomo de Reynold. Muestras EM se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai Spirit Twin, que funciona a 80 kV.

Ensayo de propagación de virus. Se llevaron a cabo ensayos de propagación para analizar la capacidad del RABV G-suprimido que expresa GP de multiplicarse BSR-RVG *trans*-complementario, así como en células BSR de tipo salvaje. Las líneas de células complementarias fueron inducidas por la separación de doxiciclina, seguido por la infección con el RV respectivo a una MOI de 0,01. Después de 2 h, se separó el virus, las células se lavaron una vez en PBS, y se repuso con medio con contenido en doxiciclina o libre de doxiciclina. Después de la incubación durante 72 h a 34°C, las células fueron fijadas con acetona al 80% y el antígeno viral fue detectado con anticuerpo monoclonal (Centocor) anti-nucleoproteína RV (RV-N), conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) utilizando un microscopio de fluorescencia.

Experimentos de patogenicidad en ratón. Todos los experimentos realizados en ratones fueron aprobados tanto por el NIAID o el Comité para el Cuidado y el Uso de Animales Institucional de la Universidad Thomas Jefferson. Los experimentos de patogenicidad en ratón se realizaron en un vivero de Bioseguridad Nivel 2.

Para la inoculación periférica, a ratones Swiss Webster de seis a ocho semanas de edad consanguíneos BALB/c o exogámicos se les administró por vía intraperitoneal (IP), intranasal (IN) o intramuscular (IM) inyecciones de virus vivo o virus inactivado con beta-propiolactona a las concentraciones indicadas en las Leyendas de Figuras. La Inyección IM se realizó mediante la administración de 50 µl en el músculo de la pata trasera (gastrocnemio). Los ratones fueron monitorizados diariamente para detectar signos clínicos y síntomas de morbilidad durante los períodos de tiempo señalados en las Leyendas de Figuras. Los ratones fueron pesados individualmente o pesados en grupo periódicamente como medida del estado de salud.

Para el análisis de la neurovirulencia viral, a camadas de diez crías de ratón Swiss Webster de 5 días de edad se les administraron inyecciones de diez µl por vía intracerebral (IC) que contienen diluciones en serie de vacunas parentales y del RABV que expresan GP. Las crías de ratón se monitorizaron diariamente para detectar signos clínicos de encefalitis y los ratones moribundos se sacrificaron humanitariamente. El número de ratones supervivientes se registró diariamente.

Inmunización y estimulación de ratones. Para los experimentos de estimulación con RABV, grupos de diez ratones BALB/c fueron inmunizados IM con vehículo, 5x10⁵ ffu de virus indicado, o 10 µg de virus inactivado el día 0 (1 dosis) o los días 0 y 14 (2 dosis). El día 30 post-inmunización, todos los ratones fueron sangrados y el suero se aisló para el análisis mediante ELISA tal como se describe más adelante. El día 50 post-inmunización, diez ratones

fueron estimulados IM con la cepa CVS-N2c del virus RABV altamente virulenta y fueron monitorizados para detectar signos de encefalitis y morbilidad durante 21 días. Los ratones moribundos fueron sacrificados humanitariamente. La supervivencia de los ratones se registró diariamente y los pesos se tomaron periódicamente. La estimulación con RABV virulento se realizó en un vivero de Bioseguridad Nivel 3.

- 5 Para la estimulación con el EBOV adaptado a ratón (MA-EBOV) (Bray et al., 1998), grupos de diez ratones BALB/c fueron inmunizados IM con vehículo, 5×10^5 FFU de virus indicado, o 10 µg de virus inactivado el día 0 (1 dosis) o los días 0 y 14 (2 dosis). El día 30 post-inmunización, todos los ratones fueron sangrados y el suero se aisló para el análisis mediante ELISA según se describe más adelante. El día 77 después de la inmunización, los ratones fueron estimulados IP con 1.000 PFU de MA-EBOV y fueron monitorizados para detectar signos de morbilidad durante 21 días. Los ratones moribundos fueron sacrificados humanitariamente. La supervivencia de ratones se registró diariamente y los pesos se tomaron periódicamente. La estimulación con MA-EBOV se realizó en un vivero de Bioseguridad Nivel 4 en la Universidad de Texas Medical Branch en Galveston, TX.

- Ensayos con Anticuerpos.** Sueros de ratón se sometieron a ensayo en un ELISA indirecto para evaluar las respuestas humerales contra EBOV-GP y RABV-G. El antígeno de GP para revestir placas de ELISA se obtuvo recolectando sobrenadantes de células de neuroblastoma de ratón transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión que codifican los aminoácidos 33-632 del ectodominio de GP o una versión truncada del ectodominio que carece del dominio de mucina (aminoácidos 312-462). Los plásmidos (Lee et al, 2008a; Lee et al., 2008b) fueron generosamente proporcionadas por el Dr. E. Ollmann Saphire, Scripps Research Institute, CA, EE.UU.). La glicoproteína del RABV se purificó como se describió previamente. Placas Maxisorb de noventa y seis pocillos (Nunc) se revistieron durante la noche con 200 µl sobrenadante de cultivo celular o 200 ng de RABV-G purificado por pocillo, se lavaron tres veces con PBST (PBS, Tween 20 al 0,05%) y después se bloquearon durante 2-3 horas con PBST que contenía leche en polvo desnatada al 5%. Las placas se incubaron a continuación con los sueros de ensayo diluidos en la relación 1:200 con PBST a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con PBST y por cada pocillo se añadieron 200 µl IgG anti-ratón de cabra conjugada a HRP (dilución 1:10.000). Dos horas más tarde, las placas se lavaron con PBST y se desarrollaron con sustrato de o-fenilendiamina SigmaFast. La reacción enzimática se detuvo con H_2SO_4 3M y la absorción se leyó a 490 nm.

- Para determinar niveles de anticuerpos neutralizantes de virus contra RABV en sueros de ratones inmunizados, se realizó un ensayo rápido de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT). En síntesis, se añadió la cepa CVS-11 de RABV, a una concentración para lograr una MOI de 1 a 24 h post-infección en el control negativo, a diluciones en serie triples de los sueros o la norma de la OMS en los medios libres de suero cellgro Complete (Mediatech) en placas de 96 pocillos, y las mezclas se incubaron a 37°C durante 1h. Se retiró el medio de las placas de 96 pocillos de células de neuroblastoma de ratón cultivadas en RPMI (Mediatech) suplementado con FBS al 10% (Atlanta Biologicals) y penicilina/estreptomycin al 1%, y las mezclas se transfirieron a las placas de células. Después de 24 h de incubación a 37°C, las células fueron fijadas con acetona al 80% y fueron teñidas con FITC anti-RV N (Fujirebio Diagnostics Inc). Se determinó el porcentaje de células infectadas por pocillo se calcularon unidades internacionales (UIs) de anticuerpo en base a la norma de la OMS, en que la dilución de la norma de la OMS, que resulta en una TCID₅₀ para el virus de estimulación es equivalente a 2 UIs de anticuerpos neutralizantes.

- EJEMPLO 2. Generación de vacunas del RABV que codifican GP de ZEBOV.** El vector de vacuna BNSP RABV (Fig. 3) se derivó de la cepa SAD B19 de la vacuna, que fue atenuada por el paso de cultivo de tejidos y que se ha utilizado como una vacuna oral viva para la vida salvaje en Europa (Conzelmann et al., 1990; Vos et al., 1999; Vos et al, 2002). La construcción fue diseñada para que contuviera una nueva secuencia señal de la transcripción de parada y arranque RABV que está flanqueada por sitios de restricción *BsiW1* y *NheI* únicos entre los genes de nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) para la introducción de genes extraños (McGettigan et al., 2003b). Mientras que BNSP es avirulento después de la administración periférica en ratones, conserva la neurovirulencia después de la inoculación intracerebral (IC). Por lo tanto, se generó un derivado adicionalmente atenuado, BNSP333, que contiene un cambio de Arg→Glu en el aminoácido 333 de la G de RABV (McGettigan et al., 2003b). La mutación 333 ha demostrado atenuar en gran medida la neurovirulencia de vectores de vacuna del RABV previos en ratones adultos, de modo que BNSP333 fue elegido como el virus parental para estos estudios.

- Se generaron dos construcciones de BNSP333 que codifican la cepa Mayinga GP de ZEBOV (Fig. 3). BNSP333-GP codifica GP de ZEBOV no modificada, mientras que BNSP333-GP_{GCD} codifica el ectodominio y el dominio de transmembrana de GP fusionado con el dominio citoplásmico de RABV G (GCD). La construcción GCD fue generada para maximizar la probabilidad de que se produjera una incorporación eficiente de GP en viriones, lo cual es crítico para potenciales vacunas inactivadas. Finalmente, se generaron dos construcciones adicionales mediante la delección del gen RABV G, BNSPAG-GP y BNSPAG-GP_{GCD}. RABV G es responsable de la unión y la entrada viral y es un mediador crítico de la neurovirulencia (Schnell et al., 2010). Por lo tanto, la delección de G resulta en virus, que están seriamente restringidos en el crecimiento y requieren la recuperación y propagación en células BSR *trans*-complementarias que expresan RABV G.

El virus infeccioso se recuperó fácilmente mediante la transfección de cada una de las cuatro construcciones de plásmido utilizando métodos estándares como se describió previamente (McGettigan et al, 2003b; Schnell et al.,

1994). Los rendimientos de virus para BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} exceden de 10^8 FFU/ml, mientras que BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD} alcanzaron concentraciones de virus de 10^6 FFU/ml, que se concentraron hasta 10^7 FFU/ml. Para evaluar el potencial de replicación *in vitro* de los virus ΔG, la propagación del virus se evaluó monitorizando el crecimiento en células BSR de tipo salvaje y células BSR *trans*-complementarias que expresan RABV G. Las células fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 0,01 con BNSPΔG-GP y BNSPΔG - GP_{GCD}. Después de dos días de incubación, las células se inmuno-tiñeron para la expresión de RABV N (Fig. 4). Como era de esperar, las células que expresan RABV G apoyaron la difusión eficiente del virus con numerosos focos de células infectadas aparentes. En contraposición, la infección de células BSR no modificadas con BNSPΔG-GP o BNSPΔG-GP_{GCD} resultó en un patrón diferente de replicación. Específicamente, se encontró que estaban infectadas células infectadas individuales o una célula vecina ocasional, lo que indica que estos virus estaban restringidos en el crecimiento como se pretendía. Sin embargo, estos resultados indican una cierta propagación del virus con delección de G, lo más probablemente mediada por GP de ZEBOV.

EJEMPLO 3. Expresión de GP de ZEBOV por vacunas del RABV recombinantes.

Para analizar si la GP de ZEBOV se expresa de manera eficiente mediante vectores de RABV, células BSR se infectaron con una MOI de 2-5 con BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} y los virus con delección de G BNSPΔG-GP, BNSPΔG-GP_{GCD} o BNSP333 como un control. Tal como se muestra en la Fig. 5A, BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} y el virus con delección de G, BNSPΔG-GP, expresaban una proteína del tamaño esperado de GP de ZEBOV tan pronto como 24 horas después de la infección. Curiosamente, para los virus que contienen G la señal para GP era lo más prominente después de 24 horas y disminuyó potencialmente a las 72 horas, indicando su eliminación eficiente con brotes de RABV a partir de la célula infectada. Este fenómeno no se detectó para el virus con delección de G BNSPΔG-GP, en potencia debido a un crecimiento más lento y una liberación de partículas virales. En el caso de BNSPΔG-GP_{GCD} los autores de la invención detectaron sólo una señal muy débil para la GP de longitud completa después de 48h, pero se detectó otra banda específica para GP prominente de aproximadamente 70 (kilodalton) kd. Mientras que se desconoce para este virus en particular el motivo del fallo de la expresión de grandes cantidades de GP que contienen G CD RABV, el bajo nivel de expresión de GP se refleja en una respuesta inmune reducida de esta construcción (véase más adelante y la Fig. 7A), lo que indica que la cantidad de GP expresada de longitud completa es crítica para la protección contra la estimulación del ZEBOV.

EJEMPLO 4. Incorporación de ZEBOV en viriones del RABV formadores de brotes.

La utilización de viriones muertos (inactivados) para una vacuna dual del RABV/EBOV requiere la incorporación de G de RABV, así como de GP de ZEBOV en viriones formadores de brotes. Para analizar la incorporación de la proteína GP de ZEBOV en viriones de RV, células BSR fueron infectadas con BNSP333, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} y el virus se aisló mediante filtración de los sobrenadantes de las células infectadas, concentración seguida de purificación sobre sacarosa al 20%. Las proteínas virales se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron por tinción con azul de Coomassie (Fig. 5B). El mismo patrón de las proteínas del RABV se detectaron para los tres virus recombinantes, pero no se detectó proteína adicional alguna del tamaño esperado para la GP de ZEBOV en las partículas virales. La falta de detección de GP puede ser debida a niveles de incorporación más bajos o a que GP discurre como una banda más difusa que las otras proteínas de RV debido a su fuerte glicosilación. Sin embargo, el análisis de los viriones recombinantes por transferencia Western con suero de un mono rhesus infectado con el ZEBOV detectó GP de ZEBOV en partículas tanto de BNSP333-gp como de BNSP333-GP_{GCD}, mientras que no se detectó señal alguna para el RABV control (BNSP333). No se detectaron diferencias en la cantidad de GP incorporada, indicando que no había ventajas del CD RV para la incorporación de GP de ZEBOV.

La incorporación de GP en viriones de RABV también se evaluó por microscopía electrónica (Fig. 5C). Células BSR se infectaron con BNSP333, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} y se analizaron por microscopía electrónica doble marcado de inmuno-oro con G anti-RABV (15 nm partículas de oro) y GP anti-ZEBOV (5 nm). Viriones BNSP333 mostraron estructuras características en forma de bala y sólo se marcaron mediante G anti-RABV como era de esperar. También se encontró que tanto los viriones BNSP333-GP como BNSP333-GP_{GCD} poseían una forma de bala similar. Además, se encontró que cada uno de los virus reaccionaba con G anti-RABV G y GP anti-ZEBOV. Estos resultados confirman, además, que la GP se incorpora en el virión de RABV y este evento no es dependiente de la presencia de la GCD, lo que indica que los viriones inactivados pueden servir como antígenos eficaces para la inducción de inmunidad a GP.

EJEMPLO 5. Patogenicidad de vacunas del RABV que expresan GP de ZEBOV en ratones.

BNSP333, el padre de los virus descritos en esta memoria, es avirulento después de la inoculación periférica e IC de ratones adultos (McGettigan et al., 2003b). Para determinar si la expresión de GP de ZEBOV dio lugar a fenotipos de virulencia alterada en ratones, los autores de la invención evaluaron la patogenicidad después de inoculación por múltiples vías (Fig. 6). A grupos de ratones adultos se les inyectaron 1×10^5 a 1×10^6 FFU de los virus indicados por vía intramuscular (IM), intranasal (IN) o intraperitoneal (IP). Los ratones fueron monitorizados diariamente durante cuatro a seis semanas en cuanto a cualesquiera signos clínicos o indicios de morbilidad. Además, los ratones fueron pesados periódicamente para evaluar el estado de salud general. Ningún ratón inoculado con BNSP333-GP,

BNSP333-GP_{GCD}, BNSPΔG-GP o BNSPΔG-GP_{GCD} desarrolló signos clínicos que indicaran que la expresión de GP de ZEBOV no dio lugar a ninguna virulencia viral inesperada. Además de ello, el análisis del porcentaje medio de cambio en el peso no mostró diferencias entre los grupos de ratones inoculados con vehículo, BNSP, BNSP-333 o los virus que expresan GP (Fig. 6).

La neurovirulencia también fue evaluada por los candidatos de vacuna por inyección IC a ratones lactantes altamente susceptibles. Ratones lactantes de cinco días de edad fueron inoculados con diluciones en serie de BNSP, BNSP-333, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} y fueron monitorizados para detectar signos de encefalitis durante 21 días. Como era de esperar, BNSP y BNSP-333 fueron letales ya que conservan una neurovirulencia, y BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} comparían un nivel similar de virulencia. En contraposición con estas observaciones, la inoculación IC con BNSPΔG-GP o BNSPΔG-GP_{GCD} con la dosis más alta posible, 6×10^4 FFU, dio lugar a signos clínicos o letalidad. Estos resultados indican que la restricción del crecimiento *in vitro* observada para los virus ΔG atenuar en gran medida la neurovirulencia, indicando que tendrán un perfil de seguridad incrementado frente a la vacuna del RABV parental, BNSP-333.

EJEMPLO 6. Vacunas del RABV que expresan GP de ZEBOV inducen inmunidad humoral a RABV y ZEBOV en ratones.

Para analizar la inmunogenicidad de los candidatos de vacunas que expresan GP, grupos de diez ratones fueron inmunizados IM con vehículo o 5×10^5 FFU de BNSP, BNSP333, BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD}, BNSPΔG-GP o BNSPΔG-GP_{GCD}. Además, se examinó la inmunogenicidad de las preparaciones de virus inactivados, generadas por los métodos utilizados para producir la vacuna inactivada del RABV humana actual. Específicamente, la inactivación de virus se realizó mediante el tratamiento de reservas de virus con beta-propiolactona 1:2000 durante la noche a 4°C, seguido de 30 min de incubación a 37°C. Grupos de diez ratones fueron inmunizados con 10 µg de BNSP333-GP o BNSP333-GP_{GCD} inactivada el día 0 (1 dosis) o los días 0 y 14 (2 dosis). El día 30 post-inmunización, el suero se aisló a partir de ratones inmunizados y la inmunidad humoral se evaluó mediante ELISAs para G de RABV y GP de ZEBOV. Los resultados en la Fig. 7A, 7C y 7B, 7D (experimentos independientes de diez ratones, cada uno de los cuales fue más tarde estimulado con RABV o MA-EBOV) indican que BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD}, BNSPΔG-GP inducían anticuerpos específicos para GP de ZEBOV, mientras que las respuestas inmunes más fuertes se detectaron en sueros de ratones inmunizados con las partículas de RABV muertos que contienen GP. BNSPΔG-GP_{GCD} parecía inducir una respuesta de anticuerpos específica para GP ligeramente más débil, según se mide por ELISA. Curiosamente, las diferencias detectadas para las respuestas humorales específicas para G de RABV mediante ELISA eran menos pronunciadas, pero de nuevo un poco más altas para las vacunas muertas (Fig. 7C). Los sueros de ratones inmunizados con los virus anteriores contenían anticuerpos neutralizantes de RABV en el intervalo de 5-45 UI, indicando que la respuesta de anticuerpos específica para GP no interfería en el desarrollo de inmunidad a G de RABV (Fig. 9).

EJEMPLO 7. Vacunas del RABV que expresan GP de ZEBOV confieren protección frente a la estimulación de RABV y ZEBOV.

En base a la fuerte inmunogenicidad inducida contra G de RABV y GP de ZEBOV, los autores de la invención examinaron seguidamente la capacidad de inmunización para conferir protección contra la estimulación de RABV virulento y EBOV adaptado a ratón (MA-EBOV) (Fig. 8). Los grupos de ratones reseñados en la Fig. 7 fueron estimulados IP con 1.000 PFU de MA-EBOV el día 77 después de la inmunización o con la cepa CVS-N2c del virus RABV altamente virulento el día 50 después de la inmunización. Todos los ratones fueron pesados y monitorizados periódicamente para detectar signos clínicos e indicios de morbilidad durante 21 días.

Nueve de cada diez ratones inmunizados con vehículo e inmunizados con BNSP333-sucumbieron a la infección letal por MA-EBOV. Una protección completa frente a la letalidad por MA-EBOV fue conferida por la inmunización con BNSPΔG-GP, INAC-BNSP333-GP (2 dosis), INAC-BNSP333-GP_{GCD} (1 dosis) e INAC-BNSP333-GP_{GCD} (2 dosis). Además, BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} e INAC-BNSP333-GP (1 dosis) conferían una protección del 80%. BNSPΔG-GP_{GCD} que confirió el nivel más bajo de protección aún inducía un 30% de supervivencia. Como se indicó anteriormente, este virus expresaba sólo cantidades muy bajas de GP (Fig. 3A) y tenía una débil respuesta según se detectó por ELISA específico para GP de ZEBOV (Figs. 7 A y 7B). Por lo tanto, el nivel más bajo de la protección no fue inesperado y se correlaciona con los datos de inmunogenicidad. El análisis de la pérdida de peso después de la estimulación con MA-EBOV, que es un indicador adicional de la eficacia de la vacuna, indica que las vacunas inactivadas fomentaban una resistencia más fuerte a EBOV ya que la pérdida de peso era mínima en el curso de la estimulación; particularmente para INAC-BNSP333-GP_{GCD} (Fig. 10). Los autores de la invención analizaron también las respuestas de anticuerpos específicas para la GP de ZEBOV mediante ELISA después de la estimulación de MA-EBOV (Fig. 7B). Como era de esperar, los anticuerpos específicos para GP aumentaron después de la estimulación en todos los ratones supervivientes. Curiosamente, los aumentos fueron más prominentes en los grupos vacunados con virus vivos, que antes habían tenido las respuestas más bajas, indicando que los altos niveles de anticuerpos específicos para GP en ratones inmunizados con los viriones muertos restringen enormemente la replicación de ZEBOV.

Los resultados de la estimulación con RABV virulento eran igualmente prometedores. Siete de nueve preparaciones de vacuna confieren una protección del 100% (Fig. 8) e INAC-BNSP333- GP (2 dosis) confería un 90% de protección. BNSP333-GP confería un 60% de protección. Cabe señalar que la estimulación con 5×10^6 ffu de CVS-N2c de RABV es un modelo muy riguroso. Análisis de anticuerpos específicos para G de RABV después de la estimulación del RABV indicó un aumento limitado de los niveles. Tomados en conjunto, estos estudios demuestran que candidatos de vacunas vivas e inactivadas confieren una protección completa o sustancial contra el MA-EBOV letal y la estimulación del RABV y el mecanismo de protección parecen depender en gran medida de los anticuerpos dirigidos contra GP de EBOV o G de RABV, respectivamente.

DISCUSIÓN DE LOS EJEMPLOS 1-7

Se han construido diversas vacunas del RABV vivas y muertas que expresan GP de ZEBOV y se ha comparado su expresión de GP, seguridad, inmunogenicidad y eficacia protectora en ratones. Los resultados indican que GP de ZEBOV es expresada de manera eficiente por vectores de RABV en presencia o ausencia de G de RABV. Además, GP se incorpora en viriones de RABV y esta incorporación no es dependiente ni es aparentemente mejorada por la adición de RABV GCD a GP. Estos resultados son algo sorprendentes, porque se propuso que proteínas extrañas requieren la adición de la GCD para la incorporación del RABV (Mebatsion y Conzelmann, 1996; Mebatsion et al, 1997). Sin embargo, Siler et al. han demostrado que el CD de CD4 fomentó la incorporación eficiente de HCV E2 en viriones de RABV (Siler et al., 2002). Sin embargo, la incorporación con éxito de GP en partículas de RABV permite el uso de viriones inactivados como un medio para vacunar contra ZEBOV. También indica que virus BNSPΔG-GP tendrían la capacidad de una propagación limitada del virus mediada por GP en ausencia de G de RABV, lo cual fue confirmado por los resultados *in vitro* de los autores de la invención, aunque los virus ΔG eran completamente avirulentos después de la estimulación IC de ratones.

Para determinar inicialmente la inmunogenicidad de los candidatos de vacunas del EBOV/RABV de los autores de la invención, se examinó la inmunidad humoral contra GP. De manera algo sorprendente, las preparaciones de vacunas inactivadas indujeron consistentemente niveles más altos de anticuerpos específicos para GP, según se mide por ELISA cuando se compara con las vacunas de virus vivos.

BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} y BNSPΔG-GP indujeron respuestas de anticuerpos bajas, pero detectables, mientras que BNSPΔG-GP_{GCD} indujo niveles de anticuerpos más débiles. En contraposición, INAC-BNSP333-GP e INAC-BNSP333-GP_{GCD} indujeron altos niveles de anticuerpos mediante una sola vacunación que podría ser reforzada eficazmente con una segunda vacunación. La presencia de GCD parecía conferir una ligera mejora en la inducción de los niveles de anticuerpos en las preparaciones de vacuna muerta. Es importante destacar que los niveles de anticuerpos pre-estimulación en ratones inmunizados con vacunas inactivadas eran similares en comparación con el nivel observado después de la estimulación para el ratón inmunizado con vehículo solo que sobrevivió la estimulación con MA-EBOV. No está claro por qué las vacunas inactivadas inducen niveles más altos de anticuerpos frente a GP en comparación con virus vivo. Una explicación podría ser que la carga antigénica es mayor en las vacunas muertas, y que las vacunas vivas están tan atenuadas periféricamente que su replicación resulta en una pequeña carga antigénica adicional. Alternativamente, G de RABV puede ser expresado anteriormente en los virus que contienen G y puede interferir con la respuesta de anticuerpos a GP. Esta última explicación se sustenta en el hecho de que para la respuesta inmune específica para G de RABV no se detectaron diferencias tan grandes como las que se ven por las respuestas humorales anti-GP (Figs. 7C y 7D). Se justifica un examen adicional de la respuesta inmune a estos candidatos de vacunas muertas y vivas.

Aunque la inmunidad humoral cuando se mide por ELISA específico para GP parecía ser baja para los candidatos de vacunas vivas, cada uno confería una protección contra MA-EBOV que parecía correlacionarse con los niveles de anticuerpos. BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} y BNSPΔG-GP inducían un 80-100% de protección, mientras que BNSPΔG-GP_{GCD}, que inducía niveles de anticuerpos más débiles, confirió un 30% de protección, lo que sugiere que puede existir un mediador o mediadores adicionales de protección. Cabe señalar que éstos eran inmunizaciones individuales seguidas de estimulación con MA-EBOV el día 77, de modo que el modelo de protección era riguroso y probablemente implicaba anticuerpos específicos para GP y una respuesta inmune de memoria dependiente de células T, según se reflejaba en el aumento de anticuerpos contra GP después de la estimulación (Fig. 3B). Las vacunas inactivadas también conferían una protección completa o del 80% frente a MA-EBOV. Dos indicios sugieren que las vacunas inactivadas conferían un mayor nivel de protección frente a MA-EBOV. En primer lugar, ratones inmunizados con vacuna inactivada tenían un menor aumento relativo en anticuerpos específicos para GP después de la estimulación con MA-EBOV cuando se compara con ratones inmunizados mediante vacunas vivas. En segundo lugar, la vacunación con vacunas inactivadas, particularmente BNSP333-GP_{GCD}, parece resultar en una menor pérdida de peso después de la estimulación con MA-EBOV que se cree que es un signo de inmunidad protectora fuerte.

Casi todas las vacunas también indujeron una protección completa frente a la estimulación con RABV virulento y, de manera similar, los resultados del ELISA se correlacionan con el nivel observado de protección. Curiosamente, tanto BNSPΔG-GP como BNSPΔG-GP_{GCD} indujeron fuertes niveles de anticuerpos específicos para G y una protección

frente a la estimulación con RABV que es presumiblemente mediada por la G presente en los viriones suministrados por la línea de células trans-complementaria.

Al igual que con todas las vacunas y particularmente vacunas de virus vivos, la demostración de la seguridad y la atenuación es primordial. Los resultados en los Ejemplos anteriores indican que la administración periférica de BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD}, BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD} a más de 190 ratones resultó en ninguna morbilidad ni signos clínicos aparentes que demuestran que estos virus conservan un fenotipo de atenuación. Es importante señalar que mientras que la cepa Mayinga de ZEBOV, la fuente de GP para los virus RV/EBOV de los autores de la invención, es avirulento en ratones y requería el paso y la adaptación genética para producir MA-EBOV, las mutaciones responsables de la virulencia en ratones fueron localizados en la proteína viral 24 y la nucleoproteína de EBOV (Ebihara et al., 2006). Por lo tanto, la secuencia de GP utilizada en las vacunas estudiadas aquí tiene la capacidad de mediar en la enfermedad en ratones, indicando que los ratones son una especie adecuada para evaluar la patogenicidad de los candidatos de vacunas de RV/EBOV. De manera similar al virus parental BNSP333, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} conservaban neurovirulencia en ratones lactantes después de inoculación IC aunque no había señales de una mayor neurovirulencia mediada por la expresión de GP de ZEBOV. Este nivel de neurovirulencia puede impedir el uso de estas vacunas vivas en seres humanos en base a la experiencia con vacunas de virus vivos anteriores para virus neurovirulentos. Por el contrario, BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD} eran avirulentos después de inoculación IC y al menos 6.000 veces menos neurovirulentos de BNSP333 medida por DL₅₀. Como tal, BNSPΔG-GP que confería una protección del 100% frente a la estimulación con RABV y EBOV puede justificar la consideración para su uso en seres humanos después de un mayor estudio de su atenuación e inmunogenicidad.

Mientras que las vacunas vivas descritas en esta memoria tienen potencial para su uso en seres humanos, la vía más expedita para obtener la licencia y utilización de una vacuna del RV/EBOV sería buscar candidatos de vacunas inactivadas. RABV inactivado por beta-propiolactona se ha utilizado para vacunar a seres humanos desde 1978 y tiene un excelente historial de seguridad (Plotkin, 1980). Los virus RABV/EBOV descritos en esta memoria fueron inactivados por el mismo método que la vacuna humana actual y se encontró que eran fuertemente inmunogénicos y protectores después de la inmunización con una dosis única de 10 µg. La vacuna humana actual se administra sin adyuvante en un régimen de tres dosis comprimidas (días 0, 7 y 21-28). Dos vacunas inactivadas del RABV se utilizan actualmente en los EE.UU., que son fabricadas por Novartis Vaccines and Diagnostics (Marburg, Alemania) o Sanofi Pasteur (Lyon, Francia) y varios fabricantes adicionales sirven para otros mercados. En base a la replicación eficiente del BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} en cultivo de tejidos y el proceso de fabricación existente y la capacidad de las vacunas del RABV, la producción de RABV/EBOV inactivados parecería ser factible y potencialmente más simplificada que algunos candidatos de vacunas del EBOV existentes (Geisbert et al., 2010). Además, la combinación de una vacuna de biodefensa deseada (EBOV) con incentivo económico limitado para el desarrollo debido a limitado potencial de mercado con una vacuna aprobada y financieramente viable tal como la vacuna del RABV es un factor único y potencialmente importante en la comercialización de una vacuna del EBOV. Es importante señalar que una vacuna inactivada del RABV/EBOV ofrecería una clara ventaja para uso en África frente a candidatos de vacunas del EBOV existentes, ya que proporcionaría protección frente a dos enfermedades. La Organización Mundial de la Salud reseña 24.000 muertes estimadas al año en África por el RABV y se cree que este número es una subestimación considerable (Cleaveland et al., 2002; Knobel et al, 2002; Schnell et al., 2010). Por lo tanto, el uso de las vacunas bivalentes descritas en esta memoria ofrecería un mayor retorno de la inversión en la salud pública.

Una segunda aplicación interesante de estas vacunas del EBOV vectorizadas con RV sería su desarrollo para su uso en poblaciones NHP amenazadas, que son muy susceptibles a los brotes letales del EBOV. La investigación de campo en la última década ha indicado que los brotes letales del EBOV han afectado al chimpancé y en particular a poblaciones de gorilas occidentales en Gabón y la República Democrática del Congo (Bermejo et al, 2006; Le Gouar et al, 2009; Leroy et al, 2004; Vogel, 2006, 2007). De hecho, se ha sugerido que el EBOV está contribuyendo a la situación de peligro del gorila occidental y que es necesaria la vacunación para proteger a las poblaciones NHP endémicas (Vogel, 2007). Con el historia de éxito de la vacunación de la vida salvaje contra RV usando cebos dispersos que contienen la cepa de la vacuna SAD B19 (virus parental de las vacunas del RV/EBOV descritas en esta memoria), se podría considerar el uso de vacunas del RV/EBOV vivas atenuadas de manera similar para la protección de NHPs en África frente al EBOV. De señalar, SAD B 19 era segura después de una sola aplicación oral de $1,5 \times 10^8$ FFU en 10 chimpancés de edades de 3,5-8 años (Anon, 1993). La restricción del crecimiento, disminución de la neurovirulencia, y eficacia protectora de BNSPAG-GP sugieren que puede ser un candidato principal para la vacunación de la vida salvaje y puede ofrecer un mayor nivel de seguridad por encima de la vacuna SAD B19. La seguridad, la estabilidad y eficacia de una vacuna del RV/EBOV requerirían un estudio exhaustivo en las especies NHP objetivo y en otros animales que pudieran topar con los cebos de vacunas. Sin embargo, la introducción de la vacuna SAD B19 RV en Europa y dispersión segura de más de 70 millones de cebos de vacunas desde la década de los años 1980 proporcionan un marco para esta tarea. Vacunas de RV/EBOV inactivadas también podrían ser consideradas para su uso en NHPs endémicos y, de nuevo, tendrían menos problemas de seguridad, pero el logro de una cobertura amplia a los animales dispersos ampliamente sería un desafío. No obstante, si las autoridades de conservación determinan que la vacunación de NHPs contra el EBOV es una acción necesaria y se proporcionan los recursos apropiados; se podrían superar los obstáculos para el uso de vacunas

vivas o muertas. Además de la protección de los NHPs amenazados, la vacunación de poblaciones endémicas de NHPs también puede ofrecer un beneficio crítico adicional a los seres humanos. La interacción de los seres humanos y NHPs infectados se ha asociado con la transmisión de EBOV a los seres humanos y el inicio de brotes posteriores, de manera que la prevención de la enfermedad en NHPs también puede servir para limitar la transmisión del EBOV en la población humana.

Los Ejemplos descritos en esta memoria demuestran la utilidad y el potencial de la plataforma de vector de vacuna del RV para el desarrollo de vacunas vivas y muertas contra el ZEBOV y potencialmente otros virus de la fiebre hemorrágica o agentes de biodefensa. Actualmente, la inmunogenicidad y la eficacia protectora de las vacunas del RV/EBOV requieren un examen en NHPs para determinar si estas vacunas merecen evaluación en los seres humanos. La investigación adicional en ratones o NHPs se justifica en el papel de la inmunidad humoral y celular en la protección por parte de los distintos candidatos de vacunas para comprender las diferencias en la inducción de inmunidad mediante vacunas competentes para la replicación, deficiente en la replicación y se correlaciona con la inmunidad frente al EBOV. Finalmente, los candidatos de vacuna RV codifican GP de especies del EBOV adicionales y se generarán virus de la fiebre hemorrágica potencialmente adicionales para producir una vacuna multivalente, de protección cruzada.

EJEMPLO 8. Virus de la vacuna del RABV que expresan GP de ZEBOV replican a altos títulos de virus en cultivo celular.

Una replicación robusta en cultivo celular apropiado es crítica para el desarrollo de una estrategia de vacunación rentable. Se evaluó la replicación de los virus RABV que expresan GP en células Vero (Figura 11 A) que son una línea celular actualmente en uso para la producción de vacunas humanas. A una MOI de 5, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} alcanzaron títulos de virus de 8,0 y 7,6 log₁₀FFU/ml, respectivamente, a los cinco días post-infección. Es importante destacar que la expresión de GP de ZEBOV no parece disminuir la producción de virus cuando los virus vectorizados se comparan con los niveles alcanzados por los virus RABV control, BNSP y BNSP333. Estos resultados demuestran que los virus RABV que expresan GP replican a niveles adecuados para la consideración de la producción de vacunas con poco esfuerzo en la optimización.

Los autores de la invención también evaluaron la replicación de los virus con delección de G (BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD}) en células Vero (A) y células BSR-G (B), un derivado de células BHK que expresa G de RABV. Como era de esperar, debido a su diseño como virus deficientes en la replicación, BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD} no se replican en células Vero debido a su falta de expresión de G de RABV G (Figura 11A). En contraposición, BNSPΔG-GP y BNSPΔG-GP_{GCD} alcanzan títulos de virus de 7,4 y 7,0 log₁₀FFU/ml, respectivamente, en células que expresan G de RABV (Figura 11B).

En resumen, estos resultados indican que cada uno de los candidatos de vacunas descrito en esta memoria se replica de manera eficiente en cultivo celular con poco esfuerzo en la optimización hasta el momento. Como tal, el enfoque vectorizado de vacuna del RABV para el desarrollo de una vacuna de filovirus puede tener ventajas de costes en comparación con las tecnologías competidoras.

EJEMPLO 9. Virus de la vacuna del RABV que expresan GP de ZEBOV son avirulentos tras la administración intracerebral a ratones adultos.

El RABV recombinante, BNSP, conserva la neurovirulencia tras la infección intracerebral (i.c.) de ratones adultos. BNSP333, el virus parental de los virus de la vacuna que expresan GP, se atenúa cuando se administra mediante inyección i.c. Los autores de la invención han tratado de determinar si la expresión de GP de ZEBOV por parte de BNSP333 modificaría la neurovirulencia. A grupos de ocho ratones de cuatro semanas de edad se les inyectaron i.c. 1x10⁵ FFU de virus de la vacuna del RABV que expresan GP o el virus con delección de G, BNSPΔG-GP, y se les monitorizó diariamente en cuanto a la supervivencia y se les pesó periódicamente como una medida de la salud general. Como era de esperar, BNSP era rápidamente letal tras inyección i.c., sucumbiendo el 100% de los ratones el día 10 (Figura 12A). En contraposición, el 100% de los ratones inoculados con BNSP333, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD}, y BNSPΔG-GP sobrevivió a la infección, y no había evidencia de pérdida de peso en estos grupos (Figuras 12A y 12B). Estos resultados indican que en un modelo altamente susceptible de neurovirulencia, los candidatos de vacunas de RABV-GP de los autores de la invención son completamente avirulentas, lo que demuestra aún más su atenuación y seguridad.

EJEMPLO 10. Virus de la vacuna del RABV que expresan GP de ZEBOV no tienen una capacidad de neuroinvasión incrementada en ratones inmunodeficientes.

Los resultados obtenidos por los autores de la invención indicaron que la inyección periférica de virus de la vacuna del RABV que expresan GP (con o sin G de RABV) por vía intramuscular (i.m.), intranasal (i.n.) o intraperitoneal (i.p.) en ratones inmuno-competentes no dio lugar a morbilidad o morbilidad. A continuación se trató de determinar el perfil de seguridad de los candidatos de vacunas de los autores de la invención en la administración periférica de ratones

inmunodeficientes ICR-SCID (Figura 13). A grupos de ocho ratones ICR-SCID de 4-6 semanas de edad se les inyectaron i.m. en la pata trasera vehículo o 1×10^6 FFU de BNSP, BNSP333, BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} o BNSPΔG-GP. Los ratones se controlaron diariamente en cuanto a signos de infección y supervivencia durante 84 días. Los resultados indicaron que 2 de 8 y 1 de 8 ratones infectados con BNSP y BNSP333 sucumbieron a la infección, respectivamente. De manera similar, 1 de 8 ratones a los que se inyectó BNSP333-GP sucumbió a la infección. Ningún ratón en los grupos vehículo, BNSP333-GP_{GCD} o BNSPΔG-GP sucumbió a la infección. Estos resultados indican que la expresión de GP no aumenta la virulencia del vector de vacuna del RABV parental en los ratones sin una inmunidad adaptativa funcional, lo cual es un indicio adicional de la seguridad de estos candidatos de vacunas.

EJEMPLO 11. Un virus de la vacuna del RABV que expresa GP de ZEBOV con una delección en el gen RABV G tiene una replicación reducida en cerebro de ratón lactante.

El análisis de neurovirulencia en cerebro de ratón lactante realizado por los autores de la invención indicó, como era de esperar, que BNSP y BNSP333 eran letales tras inyección i.c. de ratones lactantes. BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} conservaban una neurovirulencia y también eran letales. Por el contrario, BNSPΔG-GP era avirulento cuando se inyectaba i.c. con la dosis más alta disponible de hasta 6×10^4 FFU. A continuación trataron de determinar la carga viral de sus candidatos de vacunas, particularmente BNSPΔG-GP, en ratones lactantes inyectados por la vía i.c. Era de interés determinar si el virus deficiente en la replicación tenía la capacidad de replicar incluso a un nivel reducido. Con este fin, ratones Swiss Webster de cinco días de edad fueron inoculados i.c. con 1×10^5 FFU de BNSP, BNSP333, BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD} o BNSPΔG-GP (Figura 14). Los días 1, 3, 5, 6, 7, 9, 14 y 21 se sacrificaron tres ratones supervivientes por grupo, se generaron homogeneizados de cerebro, y se produjo ADNc viral (kit de síntesis de ADNc de alta fidelidad Transcriptor, Roche). El nivel de ARN genómico viral se determinó mediante un ensayo de PCR cuantitativa que fijó como objetivo la nucleoproteína de RABV (kit de sonda qPCR DyNAmo, Thermo Scientific). La carga viral más elevada era en el grupo BNSP, como se esperaba, alcanzando un máximo en casi 10,0 equivalentes genómicos Log₁₀/μg de ARN total. El pico de la carga viral de BNSP333, BNSP333-GP y BNSP333-GP_{GCD} estaba aproximadamente 10 veces reducido y retardado en comparación con BNSP. Como era de esperar, ningún ratón al que se inyectó estos virus sobrevivió pasado el día 9. En contraposición, ratones a los que se inyectó BNSPΔG-GP sobrevivieron al final del estudio y alcanzaron un pico de carga viral en el cerebro el día 9 de aproximadamente 7,0 equivalentes genómicos Log₁₀/μg de ARN total que está aproximadamente 1.000 veces reducido de los niveles observados para BNSP. Estos resultados indican que aunque BNSPΔG-GP es avirulento tras inyección i.c. de ratones lactantes, no conservan al menos alguna capacidad para replicar y persiste hasta al menos el día 21.

EJEMPLO 12. Virus de la vacuna del RABV inactivados que expresan GP de ZEBOV se pueden combinar con una vacuna adicional del RABV recombinante para inducir una respuesta de anticuerpo multivalente.

Los autores de la invención han demostrado de manera concluyente que los virus de la vacuna del RABV que expresan GP inducen eficazmente respuestas bivalentes de anticuerpos específicas para RABV y específicas para GP de ZEBOV. A continuación, trataron de determinar si la co-administración con una vacuna vectorizada del RABV adicional daría lugar a la inducción de una respuesta de anticuerpos multivalente contra tres antígenos de la vacuna. Como prueba de experimento básico utilizaron una vacuna vectorizada del RABV inactivada, previamente reseñada, que expresa un fragmento de la neurotoxina botulínica A (BoNT), denominada HC50E30 (Mustafa et al., *Vaccine* 29:2011 pág. 4638) para co-administrar con el virus del RABV inactivado de los autores de la invención que expresa GP de ZEBOV para determinar si podrían inducirse las respuestas de anticuerpos multivalentes contra G de RABV, BoNT y GP de ZEBOV. Las vacunas utilizadas en este experimento son BNSP333-GP_{GCD} inactivado, marcado como INAC-GP_{GCD} y SPBN-HC50E30 SPBN inactivado, marcado como INAC-HC50 (Figuras 15A-15C).

Grupos de cinco ratones fueron inmunizados i.m. una vez (día 0) o dos veces (días 0 y 14) con 10 μg de vehículo o el virus indicado o 20 μg de las administraciones combinadas (10 μg cada uno de los virus). El día 42, todos los ratones fueron sangrados y diluciones de suero se sometieron a ensayo mediante ELISA contra (Figura 15A) G de RABV; (Figura 15B) BoNT HC50 y (Figura 15C) GP de ZEBOV. Como se indica en la Figura 15A, cada una de las estrategias de vacunación inducía fuertes respuestas de anticuerpos contra G de RABV como era de esperar, ya que G de RABV estaba presente en cada uno de los inmunógenos. Una sola dosis o dos dosis de INAC-HC50 inducían anticuerpos específicos contra BoNT y curiosamente la administración combinada con INAC-GP_{GCD} resultó en una respuesta específica para BoNT más fuerte (Figura 15B). Finalmente, el análisis de la respuesta de anticuerpos específicos contra GP de ZEBOV indicaba que la inmunización sola o reforzada con INAC-GP_{GCD} inducía una fuerte inmunidad, como era de esperar (Figura 15C). Es importante destacar que la co-administración de INAC-GP_{GCD} e INAC-HC50 inducía niveles de anticuerpos que eran casi idénticos a la inmunización con INAC-GP_{GCD}. Estos resultados indican que mediante esta estrategia de vacunación se puede inducir una potente respuesta multivalente. La co- inmunización con tres antígenos, RABV G, BoNT y GP de ZEBOV no dio lugar a disminución alguna de la respuesta de anticuerpos contra cada uno de los inmunógenos individuales. Considerando que la estrategia de inmunización efectiva contra los filovirus médicamente relevantes probablemente requerirá una vacunación multivalente, esta prueba de experimento básico, que indica la inducción de una inmunidad multivalente, apoya aún más el mérito de la estrategia de vacunación de los autores de la invención.

EJEMPLO 13. Virus de la vacuna del RABV que expresan GP de ZEBOV pueden inducir anticuerpos específicos para GP en ratones que tienen inmunidad pre-existente a RABV.

Existe la posibilidad de que algunos miembros de la población objetivo de una vacuna contra el Ébola tales como los trabajadores de laboratorio o socorristas puedan ser vacunados previamente con la vacuna del RABV aprobada actualmente y, por lo tanto, tienen una inmunidad preexistente frente al RABV. Esta inmunidad preexistente podría interferir con la inducción de la respuesta inmune específica para GP de ZEBOV después de la inmunización con la vacuna GP vectorizada del RABV. Por lo tanto, los autores de la invención han tratado de determinar en el modelo de ratón si la vacunación previa con vacuna del RABV inhibiría la inducción de anticuerpos específicos para GP (Figuras 16A-16C). Grupos de cinco ratones fueron inmunizados una vez el día 0 con vehículo, 10 µg de SPBN-HC50E30 inactivado o 10 µg de BNSP333-GP_{GCD} inactivado. Un cuarto grupo fue inmunizado con 10 µg de SPBN-HC50E30 inactivado el día 0 seguido de 10 µg de BNSP333-GP_{GCD} inactivado el día 28. Al menos cuatro semanas después de la inmunización, el suero de cada uno de los grupos se sometió a ensayo mediante ELISA contra (Figura 16A) G de RABV; (Figura 16B) BoNT HC50 y (Figura 16C) GP de ZEBOV. Como era de esperar, cada una de las estrategias de vacunación inducía fuertes respuestas de anticuerpos contra G de RABV (Figura 16 A) y la vacunación con INAC-SPBN-HC50 o INAC-SPBN-HC50, seguida por INAC-BNSP333-GP_{GCD}, inducía potentes anticuerpos específicos contra BoNT (Figura 16B). Curiosamente, la vacunación con INAC-BNSP333-GP_{GCD} o INAC-SPBN-HC50, seguida por INAC-BNSP333-GP_{GCD}, inducía niveles similares de anticuerpos específicos contra GP (Figura 16C). Estos resultados indican que la inmunización con INAC-BNSP333-GP_{GCD} puede inducir anticuerpos específicos contra GP en presencia de inmunidad RABV pre-existente. Se confirmó la presencia de una potente respuesta de anticuerpos específicos contra G de RABV el día 28 antes de la inmunización con INAC-BNSP333-GP_{GCD} (datos no mostrados). La capacidad para inmunizar eficazmente ratones en presencia de anticuerpos específicos contra G de RABV indica que la estrategia de vacunación de los autores de la invención será eficaz en seres humanos previamente vacunados contra el RABV y que el refuerzo con diversas vacunas vectorizadas del RABV tendrá éxito.

EJEMPLO 14. Virus de la vacuna del RABV vivos e inactivados que expresan GP de ZEBOV inducen respuestas de células T específicas para GP de ZEBOV primarias y de memoria.

Los autores de la invención han demostrado que tanto las vacunas vivas como muertas del RABV que expresan GP son potentes inductores de la inmunidad humoral contra tanto G de RABV como GP de ZEBOV. Sin embargo, no existe evidencia de estudios previos que la inmunidad mediada por células T pueda ser también de importancia crítica para la inducción de inmunidad protectora contra los filovirus. Por lo tanto, estos autores determinaron si sus candidatos de vacunas vivas y muertas inducen células T específicas para GP primarias y de memoria utilizando un interferón-γ ELISPOT murino (R and D Systems) con una agrupación de péptidos de GP de ZEBOV como estimulación (Figura 17).

Grupos de ratones fueron inmunizados i.m. con 1×10^5 FFU del BNSP vivo (virus RABV) o i.p. con 1×10^7 PFU de VACV-GP, un virus vacuna que expresa GP de ZEBOV, como control. Diez µg de INAC-BNSP333-GP_{GCD} fueron administrados i.m. a dos grupos; una inmunización o dos el día 0 y el día 14. La respuesta primaria de células T en los esplenocitos se sometió a ensayo el día 7 post-inmunización mediante ELISPOT (Figura 17A). Se encontró que cada uno de los candidatos de vacuna vivo e inactivado inducía esplenocitos que expresan interferón-γ específico para GP por encima de los niveles observados en los grupos vehículo o BNSP333 control. La inmunización con BNSP333-GP_{GCD} vivo resultó en un nivel considerablemente mayor de esplenocitos que expresan interferón-γ similar a la inmunización con VACV-GP. Para el análisis de la respuesta de las células T de memoria, los ratones fueron estimulados i.p. con 1×10^7 PFU de VACV-GP, aproximadamente 4 semanas post-inmunización para inducir una respuesta de células T de recordatorio (Figura 17B). Cinco días más tarde, se retiraron los bazo y los esplenocitos se analizaron mediante ELISPOT. La inmunización con BNSP333-GP, BNSP333-GP_{GCD}, BNSPΔG-GP, y una o dos dosis de INAC-BNSP333-GP_{GCD} indujeron una respuesta de recuerdo tal como se detecta por el alto nivel de esplenocitos que expresan interferón-γ, específicos para GP cuando se compara con vehículo o grupos control de BNSP333. Es importante destacar que el virus deficiente en la replicación, BNSPAG-GP, inducía una fuerte respuesta de células T y dos dosis de la vacuna inactivada inducían una respuesta de células T a niveles equiparables a las vacunas vivas. Estos resultados indican que vacunas tanto vivas como muertas inducen respuestas de células T que indican que cada una de las estrategias de vacunación de los autores de la invención induce una potente respuesta inmune humoral y mediada por células.

INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA

Las secuencias que aparecen en esta memoria descriptiva (p. ej., en las Tablas 1 y 2 anteriores) se proporcionan como sigue:

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína (GP) de Mayinga de EBOV Zaire

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKL
SSTNQLRVGLNLEGNGVATDVPSATKRWGFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIK
KPDGSECLPAAPDGI RGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIY
RGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATEDPSSGYYSTTI RYQATGFGTN
ET EYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTI
GEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTTEDHKIM
ASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDNSTHNTVPYKLDIS
EATQVEQHHRRFDNDSTASDTPSATTAAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHS
ETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLG LITNTIAGVAGLITGGRRT RREAIVNAQPKCNP
NLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYEGPAAEGIYTEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQ
LFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
HDFVDKTLDPDQGDNDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVIIAVALFCICKFVF

SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína (GP) de Boniface de EBOV Sudán

MEGLSLLQLPRDKFRKSSFFVWVILFQKAFSMLPGVVTNSTLEVTEIDQLVCKDHL
ASTDQLKSVGLNLEGSGVSTDIPSATKRWGFRSGVPPKVF SYEAGEWAENCYNLEIK
KPDGSECLPPPPDGV RGFPRCRYVHKAQGTGPCPGDYAFHKDGAFFLYDRLASTVIY
RGVNFAEGVIAFLILAKPKETFLOSPPIREAVNYTENTSSYYATSYLEYEIEENFGAQ
HSTTLFKINNNTFVLLDRPHTPQFLFQLNDTIHLHQQLSNTTGKLIWTL DANINADI
GEWAFWENKKNLSEQLRGEELS FETLSLNETEDDDATSSRTTKGRISDRATRKYS DL
VPKDSPGMVSLHVPEGETTLPSQNSTEGRRVDVNTQETITETTATIIGTNGNNMQIS
TIGTGLSSSQILSSSPTMAPSPETQTSTTYTPKLPVMTTEESTTPPRNSPGSTTEAP
TLTTPENITTAVKTVLPQESTSNGLITSTVTGILGSLGLRKRSRRQVNTRATGKCNP
NLHYWTAQEQHNAAGIAWIPYFGPGAEGIYTEGLMHNQNALVCGLRQLANETTQALQ
LFLRATTELRTYTI LNRKAIDFLLRRWGGTCRILGPDCCIEPHDWTKNITDKINQII
HDFIDNPLPNQDNDNWWTGWRQWIPAGIGITGIIIAIIALLCVCKLLC

SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína (GP) de EBOV Costa de Marfil

MGASGILQLPRERFRKTSFFVWVILFHKVFSIPLGVVHNNTLQVSDIDKFVCRDKL
 SSTSQLKSVGLNLEGNGVATDVPTATKRWGFAGVPPKVVNCEAGEWAENCYNLAIK
 KVDGSECLPEAPEGVDRDFPCRYVHKVSGTGPCPGGLAFHKEGAFFLYDRLASTIIY
 RGTTFAGGVIAFLILPKARKDFFQSPPLHEPANMTTDPSSYYHTTTINYVVDNFGTN
 TTEFLFQVDHLTYVQLEARFTPQFLVLLNETIYSDNRRSNTTGKLIWKINPTVDTSM
 GEWAFWENKKNF TKTLSSSELSFVPVPETQNQVLDTTATVSPPI SAHNHAAEDHKEL
 VSEDSTPVVQM QNIKGKDTMPTTVTGVP TTTTPSPFPINARNTDHTKSF IGLEGPQED
 HSTTQPAKTTSQPTNSTESTTLNPTSEPSSRG TGSPSSPTVPNTTESHAELGKTTPTT
 LPEQHTAASAIPRAVHPDELSGPGFLTNTIRGVTNLLTGSRKRKRDVTPNTQPKCNP
 NLHYWTALDEGAAGLAWIPYFGPAAEGIIYTEGIMENQNGLICGLRQLANETTQALQ
 LFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPQDWTKNITDKIDQII
 HDFVDNNLPNQNDGSNWWTGWKQWVPAGIGITGVIIAIIALLCICKFML

SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína (GP) de Pennsylvania de EBOV Reston

MGSGYQLLQLPRERFRKTSFLVWVILFQRAISMPLGIVTNS TLKATEIDQLVCRDK
 LSSTSQLKSVGLNLEGNGIATDVPSATKRWGF RSGVPPKVVSYEAGEWAENCYNLEI
 KKSDGSECLPLPPDGVRGFP RCRYVHKVQGTGPCPGDLAFHKNGAFFLYDRLASTVI
 YRGTTFAEGVVAFLILSEPKKHFWKATPAHEPVNTTDDSTSYMTLTLSEMSNFGG
 NESNTLFKVDNHTYVQLDRPHTPQFLVQLNETLRRNNRLSNSTGRLTWTLDPKIEPD
 VGÉWAFWETKKNFSQQLHGENLHFQIPSTHTNNSDQSPAGTVQGKISYHPPANNSE
 LVPTDSPPVSVLTAGRTEEMSTQGLTNGETITGT TANPMTTTIAPSPMTTSEVDNN
 VPSEQPNNTASIEDSPPSASNETIYHSEMDPIQGSNNSAQSPQTKTTPAPTTSPTMQ
 DPQETANSSKPGTSPGSAAGPSQPGLTINTVSKVADSLSPTRKQKRSVRQNTANKCN
 PDLYYWTAVDEGAAGLAWIPYFGPAAEGIIYIEGVMHNQNGLICGLRQLANETTQAL
 QLFLRATTELRTYSLNRKAIDFLLQRWGGTCRILGPSCCIEPHDWTKNITDEINQI
 KHDFIDNPLPDHGDDLNLWTGWRQWIPAGIGIIGVIIAIIALLCICKILC

SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína (GP) de Bundibugyo de EBOV

MVTSGILQLPRERFRKTSFFVWVILFHKVFP IPLGVVHNNTLQVSDIDKLVC RDKL
 SSTSQLKSVGLNLEGNGVATDVPTATKRWGFAGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLDIK
 KADGSECLPEAPEGVDRGFPCRYVHKVSGTGPCPEGYAFHKEGAFFLYDRLASTIIY
 RSTTFSEGVVAFLILPETKKDFFQSPPLHEPANMTTDPSSYYHTVTLNYVADNFGTN
 MTNFLFQVDHLTYVQLEPRFTPQFLVQLNETIYTNGRRSNTTGTLIWKVNPTVDTGV
 GEWAFWENKKNF TKTLSSSELSVIFVPRAQDPGSNQKTKVTP TSFANNQTSKNHEDL
 VPEDPASVVQVRDLQRENTVPTPPPDTVPTTLIPDTMEEQTTSHYEPPNISRNHQER
 NNTAHPETLANNPPDNTTPSTPPQDGERTSSHTTPSPRPVPTSTIHPTTRETHIPTT
 MTTSHD TDSNRPNPIDISESTEPGLTNTTRGAANLLTGSRRTREITLRTQAKCNP
 NLHYWTTQDEGAAGLAWIPYFGPAAEGIIYTEGIMHNQNGLICGLRQLANETTQALQ
 LFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFIDKPLPDQTDNDNWWTGWRQWVPAGIGITGVIIAIIALLCICKFLL

SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína (GP) de la cepa Musoke del virus de Marburg

MKTTTCFLISLILIQGTKNLPILEIASNNQPQNVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQ
KVADSPLEASKRWAFRTGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPPTNIR
DYPKCKTIIHHIQGQNPFAHQGIALHLWGGAFFLYDRIASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVN
KTVHKMIFSRQGQGYRHMNLTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFGALQEYNSTKNQTCAP
SKIPPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNNTDPSSDDEDLATSGSGSGGEREPHTTSDAV
TKQGLSSTMPPTPSPQPSTPQQGGNNTNHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTTIS
TNNTSKHNFSTLSAPLQNTTNDNTQSTITENEQTSAPSITTLPTGNPTTAKSTSSK
KGPATTAPNTTNEHFTSPPTPSSTAQHLVYFRRKRSILWREGDMFPFLDGLINAPI
DFDPVPNTKTIIFDESSSSGASAEEDQHASPNI SLTLSYFPNINENTAYSGENENDCD
AELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEGLYTAVLIKNQNNLVCRLRRLANQTAKSL
ELLLRVTTTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGGTCKVLGPDCCIGIEDLSKNI SEQIDQI
KKDEQKEGTGWGLGGKWWTS DWGVLTNLGILLLLSIAVLIALSCICRIFTKYIG

SEQ ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos de NP de Mayinga de EBOV Zaire

MDSRPQKIWMAPSLTESDMDYHKILTAGLSVQQGIVRQRVIPVYQVNNLEEICQLII
QAFEAGVDFQESADSFLMLCLHHAYQGDYKLFLESGAVKYLEGHGFRFEVKKRDGV
KRLEELLPAVSSGKNIKRTLAAMPEEETTEANAGQFLSFASLFLPKLVVGEKACLEK
VQRQIQVHAEQGLIQYPTAWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMHVMAGHDAN
DAVISNSVAQARFSGLLIVKTVLDHILQKTERGVRLHPLARTAKVKNEVNSFKAALS
SLAKHGEYAPFARLLNLSGVNNLEHGLFPQLSAIALGVATAHGSTLAGVNVGEQYQQ
LREAATEAEKQLQQYAESRELDHLGLDDQEKILMNFHQKKNEISFQQTNAMVTLRK
ERLAKLTEAITAASLPKTS GHYDDDDIPFPGPINDDDNPGHQDDDDPTDSQDTTIPD
VVVDPDGSGYGEYQSYSENGMNAPDDLVLFDLDEDEDDEDTKPVPNRSTKGGQQKNSQK
GQHIEGRQTQSRPIQNVPGPHRTIHHASAPLTDNDRRNEPSGSTSPRMLTPINEEAD
PLDDADDETSSLPPLESDDDEEQDRDGTSNRTPTVAPPAPVYRDHSEKKELPQDEQQD
QDHTQEARNQDSNTQSEHSFEEMYRHILRSQGPFDVLYYHMMKDEPVVFSTSDGK
EYTYPDSLEEEYPPWLTEKEAMNEENRFVTLDGQQFYWPMNHKNKFMAILQHHQ

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de VP24 de Mayinga de EBOV Zaire

MAKATGRYNLISPKKDLEKGVVLSDL CNFLVSQTIQGWKVYWAGIEFDVTHKGMALL
HRLKTNDFAPAWSMTRNLFPHLFQNPNSTIESPLWALRVILAAGIQDQLIDQSLIEP
LAGALGLISDWLLTTNTNHFNMRTQRVKEQLSLKMLSLIRSNILKFINKLDALHVVN
YNGLLSSIEIGTQNHTIIITRTNMGFLVELQEPDKSAMNRMKPGPAKFSLLHESTLK
AFTQGSSTRMQSLILEFNSSLAI

SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos de VP30 de Mayinga de EBOV Zaire

MEASYERGRPRAARQHSDGHDHVRARSSSRENYRGEYRQSRASQVRVPTVFHKK
RVEPLTVPPAPKDICPTLKKGFLCDSSFCKKDHQLES LTDRELLLLIARKTCGSVEQ
QLNITAPKDSRLANPTADDFQEEGPKITLLTLIKTAEHWARQDIRTIEDSKLRALL
TLCVAVMTRKFSSQLSLLCETHLRREGLGQDQAEVLEVYQRLHSDKGGSFEEAALWQ
QWDRQSLIMFITAFNLIALQLPCESSAVVVSGLRTLVPQSDNEEASTNPGTCSWSDE
GTP

SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de VP35 de Mayinga de EBOV Zaire

MTTRTKGRGHTAATTQNDRMGPPELSGWISEQLMTGRIPVSDIFCDIENNPGLCYAS
QMQQTKPNPKTRNSQTQTDPICNHSFEEVVQTLASLATVVQQQTIASESLEQRITSL
ENGLKPVYDMAKTISLNRVCAEMVAKYDLLVMTTGRATATAAATEAYWAEHGQPPP
GPSLYEESAIRGKIESRDETVPQSVREAFNNLNSTTSLTEENFGKPDISAKDLRNIM
YDHLPGFGTAFHQLVQVICKLGKDSNSLDIHAEFQASLAEGDSPQCALIQTIRVP
IFQDAAPPVIHIRSRGDI PRACQKSLRPVPPSPKIDRGWVCVFQLQDGKTLGLKI

SEQ ID NO: 11: Secuencia de aminoácidos de VP40 de Mayinga de EBOV Zaire

MRRVILPTAPPEYMEAIYPVRSNSTIARGGNSNTGFLTPESVNGDTPSNPLRPIADD
TIDHASHTPGSVSSAFILEAMVNVISGPKVLMKQIP IWLPLGVADQKTYSEFSTTAA
IMLASYTITHEGKATNPLVRVNRLGPGIPDHPLRLLRIGNQAFLQEEVLPPVQLPQY
FTFDLTALKLITQPLPAATWTDDTPTGSNGALRPGISFHPKLRPILLPNKSGKKGNS
ADLTSPEKIQAIMTSLQDFKI VPIDPTKNIMGIEVPETLVHKLTGKKVTSKNGQPII
PVLLPKYIGLDPVAPGDLTMVITQDCDTCHSPASLPAVIEK

SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos de L de Mayinga de EBOV Zaire

MATQHTQYPDARLSSPIVLDQCDLVTRACGLYSSYSNLPQLRNCKLPKHIYRLKYDV
 TVTKFLSDVPVATLPIDFIVPVLLKALSGNGFCPVEPRCQQFLDEIKYTMQDALFL
 KYYLKNVGAQEDCVDEHFQEKILSSIQNEFLHQMFFWYDLAILTRGRRLNRGNSRS
 TWVHDDLIDILGYGDYVFWKIPISMLPLNTQGIPHAAMDWYQASVFKEAVQGHTHI
 VSVSTADVLIMCKDLITCRENTTLISKIAEIEDPVCSDYPNFKIVSMLYQSGDYLLS
 ILGSDGYKIIKFLEPLCLAKIQLCSKYTERKGRFLTQMH LAVNHTLEEITEMRALKP
 SQAQKIREFHRTLIRLEMTPOQLCELSIQKHWHGPVLHSETAIQKVKKHATVLKAL
 RPIVIFETYCVFKYSIAKH YFDSQGSWYSVTS DRNLTPGLNSYIKRNQFPPLPMIKE
 LLWEFYHLDHPPLFSTKIISDLSIFIKDRATAVERTCWD AVFEPNVLGYNPPHKFST
 KRVPEQFLEQENFSIENVLSY AQKLEYLLPQYRNFSFSLKEKELNVGRTFGKLPYPT
 RNVQTLCEALLADGLAKAFPSNM MVVTEREQKESLLHQASWHHTSDDFGEHATVRGS
 SFVTDLEKYNLAFRYEFTAPFIEYCNRCYGVKNVFNWMHYTIPQCYMHVSDYYNPPH
 NLTLENRDNPPPEGPSSYRGHMGGIEGLQOKLWTSISCAQISLVEIKTGFKLRS AVMG
 DNQCITVLSVFPLETDADEQE QSAEDNAARVAASLAKVTSACGIFLKPDETFVHSGF
 IYFGKKQYLNGVQLPQSLKTATRMAPLSDAIFDDLQGT LASIGTAFERSISETRHIF
 PCRITAAFHTFFSVRILQYHHLGFNKGF DLGQLTLGKPLDFGTISLALAVPQVLGGL
 SFLNPEKCFYRN LGDPVTSGLFQLKTYLRMIEMDDLFLPLIAKNPGNCTAIDFVLNP
 SGLNVPGSQDLTSFLRQIVRRITILSAKNKLINTLFHASADFEDEMCKWLLSSTPV
 MSRFAADIFSRTPSGKRLQILGYLEGTRTLLASKIINNNTETPVLDRLRKITLQRWS
 LWF SYLDHCDNILAEALTQITCTVDLAQILREYSWAHILEGRPLIGATLPCMI EQFK
 VFWLKPYEQCPQCSNAKQPGGKPFVSVAVKKHIVSAWPNASRISWTIGDGIPYIGSR
 TEDKIGQPAIKPKCPSAALREAI ELASRLTWVTQGSSNSDLLIKPFLEARVNL SVQE
 ILQMTPSHYSGNIVHRYNDQYSPHSFMANRMSNSATRLIVSTNTLGEFSGGGQSARD
 SNIIFQNVINYAVALFDIKFRNTEATDIQYNRAHLHLTKCCTREVPAQYLYTSTLD
 LDLTRYRENELIYDSNPLKGGLNCNISFDNPFQ GKRLNIEDDLIRLPHLSGWELA
 KTIMQSIISDSNNSSTDPISSETRSFTTHFLTYPKIGLLYSFGAFVSYLGN TILR
 TKKLTLDNFLYLTQTQIHNLP HRSLRILKPTFKHASVMSRLMSIDPHFSIYIGGAAG
 DRGLSDAARLFLRTSISSELT FVKEWIINRG TIVPLWIVYPLEGQNPTPVNNFLYQI
 VELLVHDSSRQQAFKTTISDHVHPHDNLVYTCKSTASNFFHASLAYWRSRHRNSNRK
 YLARDSSTGSSTNNSDGH IERSQEQTTRDPHDGTERNLVLQMSHEIKRTTIPQENTH
 QGPSFQSFLSDSACGTANPKLNFDRSRHNVKFQDHNSASKREGHQIISHRLVLPFFT
 LSQGTRQLTSSNESQTQDEISKYLRQLRSVIDTTVYCRFTGIVSSMHYKLDEVLWEI
 ESFKSAVTLAE GEGAGALLLIQKYQVKTLFFNTLATESSIESEIVSGMTTPRMLLPV
 MSKFHNDQIEIILNNSASQITDITNPTWFKDQRARLPKQVEVITMDAETTENINRSK
 LYEAVYKLILHHIDPSVLKAVVLKVFLSDTEGMLWLNDNLAPFFATGYLIKPI TSSA
 RSSEWYLCLTNFLSTTRKMPHQ NHLSCQVILTALQLQIQRSPYWL SHLTQYADCEL
 HLSYIRLGFP SLEKVLHYRYNLVDSKRGPLVSITQHLAHLRAEIRELTNDYNQQRQS
 RTQTYHFIRTAKGRITKL VNDYLKFFLIVQALKHNGTWQAEFKKLPELISVCNRFYH
 IRDCNCEERFLVQTLYLHRMQDSEVKLIERLTGLLSLFPDGLYRFD

MDKRVRGSWALGGQSEVDLDYHKILTAGLSVQQGIVRQRVIPVYVNDLEGICQHI
QAFEAGVDFQDNADSFLLLLCLHHAYQGDHRLFLKSDAVQYLEGHGFRFEVREKENV
HRLDELLENVTGGKNLRRTLAAMPEEETTEANAGQFLSFASLFLPKLVVGEKACLEK
VQRQIQVHAEQGLIQYPTSWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMHVMAGHDAN
DTVLSNSVAQARFSGLLIVKTVLDHILQKTDLGVRHLPLARTAKVKNEVSSFKAALG
SLAKHGEYAPFARLLNLSGVNNLEHGLYPQLSAIALGVATAHGSTLAGVNVGEQYQQ
LREAATEAEKQLQOYAETRELDNLGLDEQEKILMSFHQKKNEISFQQTNAMVTLRK
ERLAKLTEAITTASKIKVGDYRPPDDNDIPFPGPIYDDTHPNPSDDNPDDSRDTTIPG
GVVDPYDDESNYPDYEDSAEGTTGDLDFNLDDDDDDSRPGPPDRGQNKERAARTY
GLQDPTLDGAKKVPPELTPGSHQPGNLHITKSGSNTNQPGNMSSTLHSMTPIQEES
PDDQKDNDDESLSLDEGEDEGESISEENTPTVAPPAPVYKDTGVDTNQQNGPSST
VDSQGESEALPINSKKSSALEETYYHLLKTQGPFEAINYYHLSDEPIAFSTESGK
EYIFPDSLEEAYPPWLSEKEALEKENRYLVIDGQQFLWPEVMSLQDKFLAVLQHD

SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácidos de VP24 de Boniface de EBOV Sudán

MAKATGRYNLVTPKRELEQGVVFSDLGNFLVTPPTVQGWKVYWAGLEFDVNQKGITLL
NRLKVNDFAPAWAMTRNLFPFLFKNQOSEVQTPIWALRVILAAGILDQLMDHSLIEP
LSGALNLIADWLLTTSTNHFNMRTRQVKDQLSMRMLSLIRSNITNFINKLETLHVVN
YKGLLSSVEIGTPSYAIIITRTNMGYLVEVQEPDKSAMDIRHPGPVKFSLHSTLK
PVATSKPSSITSLIMEFNSSLAT

SEQ ID NO: 15: Secuencia de aminoácidos de VP30 de Boniface de EBOV Sudán

MERGRERGRSRSSRADQQNSTGPFRTSRISRDKTTTDYRSSRSTSQVRVPTVVFHKK
GTGTLTVPPAPKDICTLRKGFCDNFCKKDHQLES�TDRELLLLIARKTCGSTDS
SLNIAAPKDLRLANPTADDFKQDGSPKLTLLKLVETAEFWANQNINEVDDAKLRALL
TSAVLVRKFSKSQLSQLCESHLRRENLGQDQAESVLEVYQRLHSDKGGAFEALWQ
QWDRQSLTMFISAFHLVALQLSCESSTVVISGLRLLAPPSVNEGLPPAPGEYTWSED
STT

SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de VP35 de Boniface de EBOV Sudán

MQQDKTYRHHGPEVSGWFSEQLMTGKIPLTEVFVDVETKPSPTPIITIIISKNPKTTRK
SDKQVQTDASSLLTEEVKTAINSVISAVRRQTNAIESLESRIANLEASLKPVDMA
KTISSLNRSCAEMVAKYDLLVMTTGRATATAAATEAYWNEHGQAPPGPSLYEDDAIK
AKLKDPNGKVPESVKQAYTNLDSTSALNEENFGRPYISAKDLKEIYDHLPGFGTAF
HQLVQVICKIGKDNNDIHAIEFQASLAEGDSPQCALIQITKRIPTFQDASPIVH
IKSRGDIPKACQKSLRPVPPSPKIDRGWVCIFQFQDGKTLGLKI

SEQ ID NO: 17: Secuencia de aminoácidos de VP40 de Boniface de EBOV Sudán

MRRVTVPTAPPAYADIGYPMSMLPIKSSRAVSGIQQKQEVLPGMDTPSNSMRPVADD
 NIDHTSHTPNQVASAFI LEATVNVISGPKVLMKQIPIWLPLGIADQKTYSFDDSTTAA
 IMLASYTTITHFGKANNPLVRVNRLLGQIPDHPLRLLRMGNQAFLLQEFVLPVQQLPQY
 FTFDLTALKLVTQPLPAATWTDETSPSNLSGALRPGLSFHPKLRPVLLPGKTGKKGHV
 SDLTAPDKIQTIIVNLMQDFKIVPIDPAKSIIGIEVPELLVHKLITGKKMSQKNGQPII
 PVLLPKYIGLDPIISPGDLTMVITPDYDDCHSPASCSYLSEK

SEQ ID NO: 18: Secuencia de aminoácidos de L de Boniface de EBOV Sudán

MMATQHTQYPDARLSSPIVLDQCDLVTRACGLYSEYSLNPKLRITCRLPKHIYRLKYD
 AIVLRFISDVVPVATIPIDYIAPMLINVLADSKNAPLEPPCLSFLEIVNYTVQDAAF
 LNYVMNQIKTQEGVITDQLKQNIIRRVIHKNRYLSALFFWHDLSILTRGRMNRGNVR
 STWFVTNEVVDILGYGDYIFWKIPIALLPMNTANVPHASTDWYQPNIFKEAIQGHTH
 IISVSTAENVLIMCKDLVTSRFTLLIAELARLEDPVSADYPLVDDIQSLYNAGDYLL
 SILGSEGYKIIKYLEPLCLAKIQLCSQYTERKGRFLTQMHLAVIQTLRELLLNRLGLK
 KSQLSKIREFHQLLLRLRSTPQQCLCELSIQKHWHGHPVLHSEKAIQKVKNHATVLKA
 LRPIIISETYCVFKYSVAKHFFDSQGTWYSVISDRCLTPGLNSYIRRNQFPPLPMIK
 DLLWEFYHLDHPPLFSTKIIISDLSIFIKDRATAVEQTCWDAVFEPNVLGYSPPYRFN
 TKRVPEQFLEQEDFSIESVLQYAQELRYLLPQNRNFSFSLKEKELNVGRTFGKLPYL
 TRNVQTLCEALLADGLAKAFPSNMMVVTEREQKESLLHQASWHHTSDDFGEHATVRG
 SSFVTDLEKYNLAFRYEF TAPFIKYCNQCYGVRNVF'DWMHFLIPQCYMHVSDYYNPP
 HNVTLNREYPPEGPSAYRGHLGGIEGLQQKLWTSISCAQISLVEIKTGFKLRSVAM
 GDNQCITVLSVFPLESSPNEQERCAEDNAARVAASLAKVTSACGIFLKPDETFVHSG
 FIYEGKKQYLNGIQLPQSLKTAARMAPLSDAIFDDLQGTLASIGTAFERSISETRHI
 LPCRVAAAFHTYFSVRILQHHLGFGHKGSDLGQLAINKPLDFGTIALSLAVPQVLGG
 LSFLNPEKCLYRNLGDPVTSGLFQLKHYSMLVGMSDIFHALVAKSPGNCSAIDFVLN
 PGGLNVPGSQDLTSFLRQIVRRSITLSARNKLINTLFHASADLEDELVCKWLLSSTP
 VMSRFAADIFSRTPSGKRLQILGYLEGTRTLLASRMISNNAETPILERLRKITLQRW

NLWFSYLDHCDSDALMEAIQPIRCTVDIAQILREYSWAHILDGRQLIGATLPCIQEQF
 QTTWLKPYEQCVECSSTNNSSPYVSVALKRNVSAPDASRLGWTIGDGIPYIGSRT
 EDKIGQPAIKPRCPSAALREAIELTSRLTWVTQGSANSDDLIRPFLEARVNLVSQEI
 LQMPFSHYSGNIVHRYNDQYSPHSFMANRMSNTATRLMVSTNTLGEFSGGGQAARDS
 NIIFQNVINFVAVALYDIRFRNTCTSSIQYHRAHIHLTDCCCTREVPAQYLTYTTTLNL
 DLSKYRNNELIYDSEPLRGGLNCLNSIDSPLMKGPRLNIIEDDLIRLPHLSGWELAK
 TVLQSIISDSSNSSTDPISSGETRSFTTHFLTYPKIGLLYSFGALISFYLGNTILCT
 KKIGLTEFLYLYLQNQIHNLSHRSLRIFKPTFRHSSVMSRLMDIDPNFSIYIGGTAGD
 RGLSDAARLFLRIAISTFLSFVEEWVIFRKANIPLWVVYPLEGQRPDPGFLNRVK
 SLIVGIEDDKNKGSILSRSEKGSNLVYNCKSTASNFFHASLAYWRGRHRPKKTIG
 ATKATTAPHIILPLGNSDRPPGLDLNQSNDFIPTRIKQIVQGDSRNDRTTTTRLPP
 KSRSTPTSATEPPTKIYEGSTTYRGKSTDTHLDEGHNAKEFPFNPHRLVVPFFKLTK
 DGEYSIEPSPEESRSNIKGLLQHLRTMVDTTIYCRFTGIVSSMHYKLDEVLWEYNKF
 ESAVTLAEGEGSGALLLIQYGVKKLFLNTLATEHSIESEVISGYTTPRMLLSVMPR
 THRGELEVILNNSASQITDITHRDWFSNQKNRIPNDVDIITMDAETTENLDRSRLYE
 AVYTIICNHINPKTLKVVLKVFLSDLDGMCWINNYLAPMFGSGYLIKPIITSSARSS
 EWYLCLSNLLSTLRTTQHQTQANCLHVVCALQQQVQRGSYWLSHLTKYTTSSLHNS
 YIAFGFPSLEKVLHYHRYNLVDSRNGPLVSI TRHLALLQTEIRELVTDYNQLRQSRTQ
 TYHFIKTSKGRITKL VNDYLRFELVIRALKNNSTWHHEL YLLPELIGVCHRFNHNTRN
 CTCSEFLVQTLYLHRMSDAEIKLMDRLTSLVNMFPEGFRSSSV

SEQ ID NO: 19: Secuencia de aminoácidos de NP de EBOV Costa de Marfil

MESRAHKAWMTHTASGFETDYHKILTAGLSVQQGIVRQRVIQVHQVTNLEEICQLII
QAFEAGVDFQESADSFLMLCLHHAYQGDYKQFLESNAVKYLEGHGFRFEVRKKEGV
KRLEELLPAASSGKSIRRTLAAMPEEETTEANAGQFLSFASLFLPKLVVGEKACLEK
VQRQIQVHSEQGLIQYPTAWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMHMAVAGHDAN
DAVIANSVAQARF'SGLLIVKTVLDHILQKTEHGVRLHPLARTAKVKNEVNSFKAALS
SLAQHGEYAPFARLLNLSGVNNLEHGLFPQLSAIALGVATAHGSTLAGVNVGEQYQQ
LREAATEAEKQLQKYAESRELDHLGLDDQEKKILKDFHQKKNEISFQQTAMVTLRK
ERLAKLTEAITSTSLKKTGKQYDDDNDIPFPGPINDNENSEQQDDDPTDSQDTTIPD
IIVDPDDGRYNNYGDYPSETANAPEDLVLFDDLEDGEDDHRPSSSSSENNNKHSLTGT
DSNKTSNWNRNPTNMPKKDSTQNNDNPAQRAQEYARDNIQDTPTPHRALTPISEETG
SNGHNEDDIDSIPPLESDEENNTETTTITTTKNTTAPPAPVYRSNSEKEPLPQEKSQK
QPNQVSGSENTDNKPHSEQSVEEMYRHILQTQGPFDAILYYYMMTEEPIVFSTSDGK
EYVYPDSLEGEHPPWLSEKEALNEDNRFITMDDOQFYWPVMNHRNKFMAILQHKK

SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de VP24 de EBOV Costa de Marfil

MAKATGRYNLISPKKDLEKGLVLNDLCTLSVAQTVQGKVTWAGIEFDVTQKGMALL
HRLKTSDFAPAWSMTRNLFPHLFQNPNSTIESPLWALRVILAAGIQDQLIDQSLIEP
LAGALGLIADWLLTTGTNHFQMRTQQAQEQLSLKMLSLVRSNLIKFINQLDALHVVN
YNGLLSSIEIGTKSHTIIITRTNMGFLVELQEPDKSAMNTRKPGPVKFSLLHESTLK
TLAKKPATQMQUALILEFNSSLAI

SEQ ID NO: 21: Secuencia de aminoácidos de VP30 de EBOV Costa de Marfil

MEVVHERGRSRI SRQNTRDGPSHLVRARSSSRASYRSEYHTPRSASQIRVPTVFRHK
KTDLLTVPPAPKDVCP TLKKGFLCDSNFCKKDHQLES LTDRELLLLIARKTCGSTEQ
QLSIVAPKDSRLANPIAEDEFQOKDGPVTL SMLIETA EYWSKQDIKNIDDSRLRALL
TLCVMTKRF SKS QLSLLCESHLRREGLGQDQSESVLEVYQRLHSDKGGNF EAALWQ
QWDRQSLIMFITAF LNIALQLPCESSSVVISGLRMLIPQSEATEVVTPSETCTWSEG
GSSH

SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de VP35 de EBOV Costa de Marfil

MISTRAAAINDPSLP I RNQCTRGP EL SGW ISEQ LMTGKIPVHEIFNDTEPHISSGSD
CLPRPKNTAPRTRNTQTQTD PVCNHN FEDVTQAL TSLTNVIQKQALNLESLEQRIID
LENGLKPMYDMAKV I SALNRSCAEMVAKYDLLVMTTGRATATAAATEAYWEEHGQPP
PGPSLYEESAIRGKINKQEDKVPKEVQEA FRNLDSTSSLTEENFGKPDISAKDLRDI
MYDHLPGFGTAFHQLVQVICKLGKDNSALDI IHA EFQASLAEGDSPQC ALIQITKRI
PIFQDATPPTIHIRSRGDIPRACQKSLRPVPPSPKIDRGWVCIFQLQDGKTLGLKI

SEQ ID NO: 23: Secuencia de aminoácidos de VP40 de EBOV Costa de Marfil

MRRIILPTAPPEYMEAVYPMRTMNSGADNTASGPNYTTTGVM TNDTPSNSLRPVADD
NIDHPSHTPNSVASAF ILEAMVNVISGP KVL MKQIP IWLPLGVSDQKTY SFDSTTAA
IMLASYTITHFGKTSNPLVRINRLGPGIPDHPLRLLRIGNQAF LQEFVLPPVQLPQY
FTFDLTALKLITQPLPAATWTDETPAVSTGTLRPGISFHPKLRPILLPGRAGKKGSN
SDLTSPDKIQAIMNFLQDLKIVPIDPTKNIMGIEVPELLVHRLTGKKTTTKNGQPII
PILLPKYIGLDPLSQGDLTMVITQDCDSCHSPASLPPVNEK

SEQ ID NO 24: Secuencia de aminoácidos de L de EBOV Costa de Marfil

MATQHTQYPDARLSSPIVLDQCDLVTRACGLYSAYSLNPQLKNCRLPKHIYRLKYDT
 TVTEFLSDVPVATLPADEFVPTFLRTLSGNGSCPIDPKCSQFLEEIVNYTLQDIRFL
 NYLNRAGVHNDHVD RDFGQKIRNLICDNEVLHQMFHWYDLAILARRGRNLNRGNRS
 TWFASDNLDILGYGDYIFWKIPLSLLPVDTOGLPHAADWYHESVFKEAIQGHTHI
 VSISTADVLIMCKDIIITCRFNTLLIAAVANLEDSVHSDYPLPETVSDLYKAGDYLI
 LLGSEGYKVIKFLEPLCLAKIQLCSNYTERKGRFLTQMH LAVNHTLEELTGSREL RP
 QQIRK VREFHQMLINLKATPQQLC ELSVQKHWGHPVLHSEKAIQKVKKHATVIKAL
 RPIIIFETYCVFKYSIAKH YFDSQGTWYSVTS DRCLTPGLSSYIKRNQFPPLPMIKE
 LLWEFYHLDHPPLFSTKVISDLSIFIKDRATAVEKTCWD AVFEPNVLGYNPPNKFAT
 KRVPEQFLEQENFSIESVLHYAQRLEYLLPEYRNFSFSLKEKELNIGRAFGKLPYPT
 RNVQTLCEALLADGLAKAFPSNMMVTEREQKESLLHQASWHHTSDDFGENATVRGS
 SFVTDLEKYNLAFRYEFTAPFIEYCNRCYGV RNLFNWMHYTIPQCYIHVS DYNNPPH
 GVSLENRENPPPEGPSSYRGHLGGIEGLQOKLWTSISCAQISLVEIKTGFKLRSAVMG
 DNQCITVLSVFPLETESSEQELSS EDNAARVAASLAKVTSACGIFLKPDET FVHSGF
 IYFGKKQYLNGVQLPQSLKTATRIAPLSDAIFDDLQGT LASIGTAFERSISETRHVV
 PCRVAAAFHTFFSVRILQYHHLGFNKGTDLGQLSLSKPLDFGTITLALAVPQVLGGL
 SFLNPEKCFYRN LGDPVTSGLFQLKTYLQMIHMDDLFLPLIAKNPGNCSAIDFVLNP
 SGLNVPGSQDLTSFLRQIVRRITITLSAKNKLINTLFHSSADLEDEMVC KWLLSSTPV
 MSRFAADIFSRTPSGKRLQILGYLEGTRTLLASKIINHNTETPI LDRLRKITLQRWS
 LWF SYLDHCDQVLADALTQITCTVDLAQILREYTWAHILEGRQLIGATLPCILEQLN
 VIWLKPYEHCPKCAKSANPKGEFVSIAIKKHVVS AWPDQSRLSWTIGDGIPYIGSR
 TEDKIGQPAIKPKCPSAALREAIELTSRLTWVTQGGANS DLLVKPFIEARVNLSVQE
 ILQMTPSHYS GNIVHRYNDQYSPHSFMANRMSNSATRLVVSTNTLGEFSGGGQSARD
 SNIIFQNVINFAVALEFDLRFRNVATSSIQHHRAHLHLSKCCTREVPAQYLVYTSTLP
 LDLTRYRDNELIYDDNPLRGGLN CNLSFDNPLFKGQRLNII EEDLIRLPYLSGWELA
 KTVIQSIISDSNNSSTDPISSGETRSFTTHFLTYPKIGLLYSFGALISYYLGNTIIR
 TKKLT LNNFIYYLATQIHNLPHRSLRILKPTLKHASVISRLISIDSHFSIYIGGTAG
 DRGLSDAARLFLRTAITVFLQFVRKWIVERKTAIPLWVIYPLEGQSPSPINSFLHHV
 IALLQHES SHDHVCAAEAH SRVETFDNLVYMCKSTASNEFFHASLAYWRSRSKNQDKR
 EMTKILSLTQTEKKNSFGYTAHPESTAVLGSLQTS LAPPSPADEATYDRKNKVLKAS
 RPGKYSQNTTKAPPNQTSCRDVSPNITGTDGCPSANEGS NSNNNNLVSHRIVLPFFT
 LSHNYNERPSIRKSEGTTEIVRLTRQLRAIPDTTIYCRFTGIVSSMHYKLDEVLWEF
 DNFKSAITLAEGEGSGALLLLQKYKVETLFFNTLATEHSIEAEIISGITTPRMLLP
 MSRFHGGQIKVTLNNSASQITDITNPSWLADQKSRI PKQVEIITMDAETTENINRSK
 LYEA VQQLIVSHIDPNALKVVVLKVFLSDIDGILWLNDNLTPFLGLGYLIK PITSSP
 KSSEWYLCLSNLLSTSRRLP HQSHTTCMHVIQTALQLQIQRSSYWL SHLVQYANHNL
 HLDYINLGFPSLERVLYHRYNLVDSQKGPLTSIVQHLAHLQTEIRELVNDYNQQRQS
 RTQTYHF IKTIKGRITKL VNDYLKFFLI IQALKHNCTWQEELRALPD LISVCTREYH
 TRNCSCENRFLVQTLYL SRMQDSEIKLIDRLTGLLSLCPNGFFR

MDRGTRRIWVSQNQGD TDL DYHKILTAGLTVQQGIVRQKII SVYLV DNLEAMCQLVI
QAFEAGIDFQENADSFLLMLCLHHAYQG DYKLFLESNAVQYLEGHGFKFELRKKDGV
NRLEELLPAATSGKNIRRTLAALPEEETTEANAGQFLSFASLFLPKLVVGEKACLEK
VQRQIQVHAEQGLIQYPTAWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKYLLIHQGMH MVAGHDAN
DAVIAN SVAQARFSGLLIVKTVLDHILQKTDQGVRLHPLARTAKVRNEVNAFKAALS
SLAKHGEYAPFARLLNLSGVNNLEHGLYPQLSAIALGVATAHGSTLAGVNVGEQYQQ
LREAATEAEKQLQOQYAESRELD SLGLDDQERRILMNFHQKKNEISFQQT NAMVTLRK
ERLAKLTEAITLASRPNLGS RQDDGNEIPFP GPI SNNDPDQDHLEDDPRDSRDTIIPN
GAIDPEDGDFENYNGYHDDEVGTAGDLVLF DLDDHEDDNKAFEPQDSSPQS QREIER
ERLIHPPPGNNKDDNRASDNNQOSADSEEQGGQYNWHRGPERTTANRRLSPVHEEDT
LMDQGDDDPSSLPPLESDDDDASSSQQDPDYTAVAPPAPVYRSAEAHEP PHKSSNEP
AETSQ L NEDPDIGQSKSMQKLEETYHLLRTQGPFEAINYYHMMKDEPVIFSTDDGK
EYTPDSLEEAYPPWLTEKERLDKENRYIYINNQQFFWPVMSPRDKFLAILQH HQ

SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácidos de VP24 de Pennsylvania EBOV Reston

MAKATGRYNLVPPKKDMEKGVIFSDLCN FLITQT LQGWKVYWAGIEFDVSQKGMALL
TRLKT NDFAPAWAMTRNLFP HLFQNPNSVIQSPIWALRVILAAGLQDQLLDHSLVEP
LTGALGLISDWLLTTTSTHFNLRTRSVKDQLSLRMLSLIRSNILQFINKLDALHVVN
YNGLLSSIEIGTSTHTIIITRTNMGFLVEVQEPDKSAMNSKRPGPVKFSLLHESAFK
PFTRVPQSGMQSLIMEFN SLLAI

SEQ ID NO: 27: Secuencia de aminoácidos de VP30 de Pennsylvania EBOV Reston

MEHSRERGRSSNM RHNSREPYENPSRSRSLSRDPNQVDRRQPR SASQIRVPNLFHRK
KTDALIVPPAPK DICPTLKKGFLCDSKFCKKDHQLD SLNDHELLLLIARRTC GIIES
NSQITSPKDMRLANPTAEDFSQGN SPKLT LAVLLQIAEHWATRD LRQIEDSKLRALL
TLCAVLTRKF SKSQLGLLCETHLRHEGLGQDQADSVLEVYQRLHSDKGGNF EAALWQ
QWDRQSLIMFISAFLNIALQIPCESSSVVVSGLATLYPAQDNSTPSEATNDTTWSST
VE

SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de VP35 de Pennsylvania EBOV Reston

MYNNKLKVCSGPETTGWISEQLMTGKIPVTDIFIDIDNKPDQMEVRLKPSSRSSTRT
CTSSSQTEVNYVPLLKKVEDTLTMLVNATSRQNA AIEALENRLSTLESSLKPIQDMG
KVISSLNRSCAEMVAKYDLLVMTTGRATSTAAAVDAYWKEHKQPPPGPALYEENALK
GKIDDPNSYVPDAVQEAYKNLDSTSTLTEENFGKPYISAKDLKEIMYDHLPGFGTAF
HQLVQVICKIGKDNLLDTIHA EFQASLADGDS PQCALIQITKRVP I FQDVPPPIIH
IRSRGDIPRACQKSLRPAPPSPKIDRGWVCLFKMQDGKTLGLKI

SEQ ID NO: 29: Secuencia de aminoácidos de VP40 de Pennsylvania EBOV Reston

MRRGVLPTAPPAYNDIAYPMSILPTRPSVIVNETKSDVLAVPGADVPSNSMRPVADD
 NIDHSSHTPSGVASAFILEATVNVISGTKVLMKQIPIWLPLGVADQKIYSFDSTTAA
 IMLASYTVTHFGKISNPLVRVNRLLGPGIPDHPLRLLRLGNQAFLOEFVLPPVQLPQY
 FTFDLTALKLITQPLPAATWTDETPAGAVNALRGLSLHEKLRPILLPGKTGKKGHA
 SDLTSPDKIQTIMNAIPDLKIVPIDPTKNIVGIEVPELLVQRLTGKKPQPKNGQPII
 PVLLPKYVGLDPISPGDLTMVITQDCDSCHSPASHPHYHMDKQNSYQ

SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de L de Pennsylvania EBOV Reston

MATQHTQYPDARLSSPIVLDQCDLVTRACGLYSSYSNPQLRQCKLPKHIYRLKFDT
 IVSKFLSDTPVATLPIDYLVPIILLRSLTGHGDRPLTPTCNQFLDEIINYTLHDA AFL
 DYYLKATGAQDHLTNIA TREKLNKNEILNNDYVHQLEFFWHDLSILARRGRLN RGNRS
 TWLVHDEFIDILGYGDYIFWKIPLSLLPVTIDGVPHAATDWYQPTLFKESILGHSQI
 LSVSTAEILIMCKDIITCRFNTSLIASIAKLEDVDVSDYDPDSDILKIYNAGDYVIS
 ILGSEGYKIIKYLEPLCLAKIQLCSKFTERKGRFLTQMHL SVINDLRELISNRRLKD
 YQQEKIRDFHKILLQLQLSPQQFCELFSVQKHWHGHPILHSEKAIQKVKRHATILKAL
 RPNVIFETYCVFKYNI AKHYFDSQGTWYSVISDRNLTPGLNSFIKRNHFP SLPMIKD
 LLWEFYHLNHPPLFSTKVISDLSIFIKDRATAVEQTCWDAVFE PNVLGYNPPNKEST
 KRVPEQFLEQEDFSIESVLNYAQELHYLLPQNRNFSFSLKEKELNIGRTFGKLPYLT
 RNVQTLCEALLADGLAKAFPSNMMVVTEREQKESLLHQASWHHTSDDFGENATVRGS
 SFVTDLEKYNLA FRYEFTAPFIEYCNHCYGVNRNVFNWMHYLIPQCYMHVSDYYNPPH
 NVNLSNREYPPEGPSSYRGHLGGIEGLQQKLWTSISCAQISLVEIKTGFKLRSAVMG
 DNQCITVLSVFPLKTDPEEQEQSAEDNAARVAASLAKVTSACGIFLKPDETFVHSGF

IYFGKKQYLNQVQLPQSLKTAARMAPLSDAIFDDLQGTLASIGTAFERAISETRHIL
 PCRIVAAFHTYFAVRILQYHHLGFNKGIDLGQLSLSKPLDYGTITLTLAVPQVLGGL
 SFLNPEKCFYRNFQDPVTSGLFQLRVYLEMVNMKDLFCPLISKNPNCNSAIDFVLNP
 SGLNVPGSQDLTSFLRQIVRRSITLTARNKLINTLFHASADLEDEMVCWLLSSNPV
 MSRFAADIFSRTPSGKRLQILGYLEGTRTLLASKIINNSETPVLDKLRKITLQRWN
 LWF SYLDHCDQLLADALQKISCTVDLAQILREYTWSHILEGRSLIGATLPCMVEQFK
 VKWLGQYEPCEPLNKKGSNAYVSVAVKDQVVSAPNTSRISWTIGSGVPYIGSRTE
 DKIGQPAIKPRCPSSALKEAIELASRLTWVTQGGSNSEQLIRPFLEARVNLVSSEVL
 QMTPSHYSGNIVHRYNDQYSPHSFMANRMSNTATRLIVSTNTLGEFSGGGQAARDSN
 IIFQNVINLAVALYDIRFRNTNTSDIRHNRAHLHLTECCTKEVPAQYLTYTSALNLD
 LSRYRDNELIYDSNPLKGGNLNCNLTIIDSPLVKGPRLNMIEDDLLRFPHLSGWELAKT
 VVQSIISDNSNSSTDPISSGETRSFTTHELTYPQIGLLYSFGAVLCFYLGNTILWTK
 KLDYEQFLYYLHNQLHNLPHRALRVFKPTFKHASVMSRLMEIDSNFSIYIGGTSGDR
 GLSDAARLFLRTAIAASFLLQFLKSWIIDRQKTIPLWIVYPLEGQQPESINEFLHKILG
 LLKQGPKSIPKEVSIQNDGHLDLAENNYVYNSKSTASNFFHASLAYWRSRKSRTQD
 HNDFSRGDGTLTEPVRFKSSNHQSDEKYYNVTCGKSPKPQERKDFSQYRLSNNGQTM
 SNHRKKKGKFKWNPCKMLMESQRGTVLTEGDYFQNNTPPTDDVSSPHRLILPFFKLG
 NHHHAHDQDAQELMNQNIQYLYHQLRSMMLDTTIYCRFTGIVSSMHYKLDEVLLLEYS
 FDSAITLAEGEGSGALLLLQKYSTRLLFLNTLATEHSIESEVVSGESTPRMLLPIMQ
 KVHEGQVTIVILNNSASQITDITSSMWLSNQKYNLPCQVEIIMMDAETTENLNRSQLY
 RAVYNLILDHIDPQYLKVVVLKVFLSDIEGILWINDYLAPLFGAGYLIKPIITSSARS
 SEWYLCLSNLISTNRRSAHQTHKACLGVIRDALQAQVQRGVYWLSHIAQYATKNLHC
 EYIGLGFPSELEKVLYHRYNLVDITGLGPLSSVIRHLTNLQAEIRDLVLDYNLMRESRT
 QTYHFIKTAKGRITKLVNDFLKFSLIVQALKNNSSWYTELKKLPEVINVCNRFYHTH
 NCECQEKFFVQTLYLQRLRDAEIKLIERLTGLMRFYPEGLIYSNHT

SEQ ID NO: 31: Secuencia de aminoácidos de NP de Bundibugyo de EBOV

MDPRPIRTWMMHNTSEVEADYHKILTAGLSVQQGIVRQRIIPVYQISNLEEVQCQLII
 QAFAEAGVDFQDSADSFLLMLCLHHAYQGDKQFLESNAVKYLEGHGFRFEMKKKEGV
 KRLEELLPAASSGKNIKRTLAAMPEEETTEANAGQFLSFASLFLPKLVVGEKACLEK
 VQRQIQVHAEQGLIQYPTSWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMHMOVAGHDAN
 DAVIANSVAAQARFSGLLIVKTVLDHILQKTEHGVRHLPLARTAKVKNEVSSFKAALA
 SLAQHGEYAPFARLLNLSGVNNLEHGLFPQLSAIALGVATAHGSTLAGVNVGEQYQQ
 LREAATEAEKQLQKYAESRELDHLGLDDQEKILKDFHQKKNEISFQQTAMVTLRK
 ERLAKLTEAITSTSILKTGRRYDDNDIPFPGPINDNENSGQNDDDPTDSQDTTIPD
 VIIDPNDGGYNNYSYANDAAAPDDLVLFDLEDEDDADNPAQNTPEKNDRPATTKL
 RNGQDQDGNQGETASPRVAPNQYRDKMPQVQDRSENHDQTLQTQSRVLTPISEED
 PSDHNDGDNESIPPLESDDEGSTDTTAAETKPATAPPVYRSISVDDSVPSENIPA
 QSNQTNNEEDNVRNNAQSEQSIAEMYQHILKTQGPFDAILYHMMKEEP IIFSTSDGK
 EYTPDSDLEDEYPPWLSEKEAMNEDNRFITMDGQQFYWPVMNHRNKFMAILQHHR

SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos de VP24 de Bundibugyo de EBOV

MAKATGRYNLVSPKKDLERGLVLSDLCTFLVDQTIQGWRVTWVGIEFDIAQKGMALL
HRLKTADFAPAWSMTRNLFPHLFQNSNSTIESPLWALRVILAAGIQDQLIDQSLVEP
LAGALSLVSDWLLTTNTNHFQMRTQHAKEQLSLKMLSLVRSNLIKFIQDLALHVVN
YNGLLSSIEIGTRNHTIIITRTNMGFLVELQEPDKSAMNQKKPGPVKFSLLHESTFK
ALIKKPATKMQUALILEFNSSLAI

SEQ ID NO: 33: Secuencia de aminoácidos de VP30 de Bundibugyo de EBOV

MDSFHERGRSRTIRQSARDGPPSHQVRTRSSSRDSHRSEYHTPRSSSQVRVPTVFHRK
RTDSLTVPPAPKDICTLRKGFCDNFCKKDHQLESITDRELLLLLIARKTCGSLEQ
QLNITAPKDTLANPIADDFQQKDGPKITLLTLETAEYWSKQDIKGIDDSRLRALL
TLCVMTKRFKSKSQLSLLCESHLRREGLGQDQSESVLEVYQRLHSDKGGNFEAALWQ
QWDRQSLIMFITAFNLIALQLPCESSSVVISGLRLLVPQSEDTESTYTETRAWSEE
GGPH

SEQ ID NO: 34: Secuencia de aminoácidos de VP35 de Bundibugyo de EBOV

MTSNRARVTYNPPPTTTGTRSCGPESLGSWISQLMTGKIPITDIFNEIETLPSISPS
IHSKIKTPSVQTRSVQTQTDPNCHDFAEVVKMLTSLTLVVQKQTLATESLEQRITD
LEGLKPVSEITKIVSALNRSCEMVAKYDLLVMTTGRATATAAATEAYWAEHGRPP
PGPSLYEEDAIRTKIGKQGDMPKEVQEAERNLDSTALLTEENFGKPDISAKDLRNI
MYDHLPGFGTAFHQLVQVICKLGKDNSSLDVIHAEFQASLAEGDSPQCALIQITKRI
PIFQDAAPPV:IHIRSRGDIPKACQKSLRPVPPSPKIDRGWVCIFQLQDGKTLGLKI

SEQ ID NO: 35: Secuencia de aminoácidos de VP40 de Bundibugyo de EBOV

MRRAILPTAPPEYIEAVYPMRTVSTINSTASGPNFPAPDVMSDTPSNSLRPIADD
NIDHPSHTPTSVSSAFILEAMVNVISGPKVLMKQIPIWLPLGVADQKTYSFDDSTTAA
IMLASYTITHF GKTSNPLVRINRLGPGIPDHPLRLLRIGNQAFLEFVLPPVQLPQY
FTFDLTALKLITQPLPAATWTDTPGTGILRPGISFHPKLRPILLPGKTGKRGSS
SDLTSPDKIQAIMNFLQDLKLVPIDPAKNIMGIEVPELLVHRLTGKKITTKNGQPII
PILLPKYIGMDPISQGDLTMTVITQDCDCHSPASLPPVSEK

SEQ ID NO: 36: Secuencia de aminoácidos de L de Bundibugyo de EBOV

MATQHTQYPDARLSSPIVLDQCDLVTRACGLYSSYSLNPQLKNCRLPKHIYRLKFDA
 TVTKFLSDVPIVTLPIIDYLTPLLLRTLSGEGLCPVEPKCSQFLDEIVSYVLQDARFL
 RYYFRHVGVDHDDNVGKNFEPKIKALTYDNEFLQQLFYWYDLAILTRRGRLNRRGNNRS
 TWFANDDLIDILGYGDYIFWKIPLSLLSLNTEGIPHAADWDYHASIFKEAVQGHSTH
 VSVSTADVLIMCKDIITCRFNTTLIAALANLEDSICSDYPQPETISNLYKAGDYLLS
 ILGSEGYKVIKFLEPLCLAKIQLCSNYTERKGRFLTQMHLAVNHTLEELIEGRGLKS
 QQDWKMREFHRILVNLKSTPQQLCLEFSVQKHWGHPVLHSEKAIQKVKKHATVIKAL
 RPVIIFETYCVFKYSIAKHYFDSQGSWYSVISDKHLTPGLHSYIKRNQFPPLPMIKD
 LLWEFYHLDHPPLFSTKIISDLSIFIKDRATAVEKTCWDAVFEPNVLGYSPPNKFST
 KRVPEQFLEQENFSIDSVLTYAQRLDYLLPQYRNFSFSLKEKELNVGRAFGKLPYPT
 RNVQTLCEALLADGLAKAFPSNMMVVTEREQKESLLHQASWHHTSDDFGENATVRGS
 SFVTDLEKYNLAFRYEF TAPFIEYCNRCYGVKNLFNWMHYTIPQCYIHVSDYYNPPH
 GVSLENREDPPEGPSSYRGHLGGIEGLQQKLWTSISCAQISLVEIKTGFKLRSÄVMG
 DNQCITVLSVFPLETDSNEQEHSSSEDNAARVAASLAKVTSACGIFLKPDETFVHSGF
 IYFGKKQYLVNGVQLPQSLKTATRIAPLSDAIFDDLQGTLASIGTAFERSISETRHVY
 PCRVVAAFHTEFFSVRILQYHHLGFNKGTDLGQLSLSKPLDFGTITLALAVPQVLGGL
 SFLNPEKCFYRNLGDPVTSGLFQLRTYLQMINMDDLFLPLIAKNPGNCSAIDFVLNP
 SGLNVPGSQDLTSFLRQIVRRITITLSAKNKLINTLFHSSADLEDEMCKWLLSSTPV
 MSRFAADIFSRTPSGKRLQILGYLEGTRITLLASKVINNNAETPILDRLRKITLQROWS
 LWFSYLDHCDQVLADALIKVSCTVDLAQILREYTWAHILEGRQLIGATLPCMLEQFN
 VFWLKSIEQCPKCAKSRNPKGEFVSIAIKKQVVSAPNQSRLNWTIGDGVPIYIGSR
 TEDKIGQPAIKPKCPSAALREAIELTSRLTWVTQGGANSDDLKVPFVEARVNLVSQE
 ILQMTPSHYSGNIVHRYNDQYSPHSFMANRMSNSATRLVVSTNTLGEFSGGGQSARD
 SNIIFQNVINFVALFDLRFRTTETSSIQHNRAHLHLSQCCTREVPAQYLTYTSTLS
 LDLTRYRENELIYDNNPLKGGNLNCNLSFDNPLFKGQRLNIIEDDLIRFPHLSGWELA
 KTI IQSIISDSNNSSTDPISSGETRSFTTHFLTYPKVGLLYSFGAIVSYLGNTHIR
 TKKLDLSHFMYLTTQIHNLPHRSLRILKPTFKHVSVISRLMSIDPHFSIYIGGTAG
 DRGLSDATRLFLRVAISSFLQFIKKWIVEYKTAIPLWVIYPLEGQNPDPINSFLHLI
 IALLQNESPQNNIQFQEDRNNQQLSNDLVYMCKSTASNFFHASLAYWRSRHKGRPKN
 RSTEEQTVKPIPYDNFHSVKCASNPPSIPKSKSGTQGS SAFFEKLEYDKERELPTAS
 TPAEQSKTYIKALSSRIYHGKTPSNAAKDDSTTSKGCDSKEENAVQASHRIVLPFFT
 LSQNDYRTPSAKKSEYITEITKLIRQLKAIPDTTVYCRFTGVVSSMHYKLDEVLWEF
 DSFKTAVTLAEGEGSGALLLQKYKVRTIFFNTLATEHSIEAEIVSGTTTPRMLLPV
 MAKLHDDQINVILNNSASQVTDITNPAWFTDQKSRIPTQVEIMTMDAETTENINRSK
 LYEAIQQLIVSHIDTRVLKIVIIKVFLSDIEGLLWLNHDLAPLFGSGYLIKPTTSSP
 KSSEWYLCLSNFLSASRRRPHQGHATCMQVIQTALRLQVQRSSYWLSHLVQYADINL
 HLSYVNLGFPSLEKVLYHRYNLVDSRKGPLVSILYHLTHLQAEIRELVCDYNQQRQS
 RTQTYHFIKTTKGRITKL VNDYLK FYLVVQALKHNCWQEELRTLPLDINV CNRFYH
 IRDCSCEDRFLIQTLTYLTRMQDSEAKLMERLTGFLGLYPNGINA

MDLHSLLELGTKPTAPHVRNKKVILFDTNHQVSICNQIIDAINSGIDLGDLLLEGGLL
 TLCVEHYNSDKDKFNTSPIAKYLRDAGYEFDVIKNADATRF LDVIPNEPHYSPLIL
 ALKTLESTESQRGRIGLFLSFCSLFLPKLVVGDRASIEKALRQVTVHQEQGIVTYPN
 HWLTTGHMKVIFGILRSSFILKFVLIHQGVNLVTGHDAYSIIISNSVGQTRFSGLLI
 VKTVLEFILQKTD SGVTLHPLVRTSKVKNEVASFKQALS NLARHGEYAPFARVLNLS
 GINNLEHGLYPQLSAIALGVATAHGSTLAGVNVGEQYQQLREAAHDAEVKLQRRHEH
 QEIQAI AEDDEERKILEQFHLQKTEITHSQT LAVLSQKREKLARLAAEIENNIVEDQ
 GFKQS QNRVSQSFLNDPTPVEVTVQARPMNRPTALPPP VDDKIEHESTEDSSSSSSSF
 VDLNDPFALLNEDED TLDD SVMIPGTT SREFQGIPEPPRQS QDLNNSQ GKQEDESTN
 PIKKQFLRYQELPPVQEDDESEYTTDSQESIDQPGSDNEQGV DLP PPPLYAQEK RQD
 PIQHPAANPQDPFGSIGDVNGDILEPIRSPSSPSAPQEDTRMREAYELSPDFTNDED
 NQQNWPQRVVTKKGR TFLYPNDLLQTNPPESLIT ALVEEYQNPVSAKELQADWPDM S
 FDERRHVAMNL

SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácidos de VP24 de la cepa Musoke del virus de Marburg

MAELSTRYNLPANVTENSINLDLNSTARWIKESVGGWTVKWGNFVFHIPNTGMTLL
 HHLKSNFVVP EWQQTRNLF SHLFKNPKSTIIEPFLALRILLGVALKDQELQQSLIPG
 FRSIVHMLSEWLLLEVTS AIHISPNLLGIYLTSDMFKILMAGVKNFFNKMFTLHVVN
 DHGKPS SIEIKLTGQQIIITRVNMGFLVEVRRIDIEPCCGETVLSES VVFGLVAEAV
 LREHSQMEKGQPLNLTQYMNSKIAI

SEQ ID NO: 39: Secuencia de aminoácidos de VP30 de la cepa Musoke del virus de Marburg

MQQPRGRSRTNRNHQVTPTIYHETQLPSKPHYTNYHPRARSMSSSTRSSAESSPTNHIP
 RARPPSTFNLSKPPPPPKDMCRNMKIGLPCADPTCNRDHDLNLTNRELLLLMARKM
 LPNTDKTFRSPQDCGSPSLSKGLSKDKQEQT KDVLTLNLGHILSYLHRSEIGKLDE
 TSLRAALSLTCAGIRKTNRSLINTMTELHMNHENLPQDQNGVIKQTYTGIHLDKGGQ
 FEAALWQGWDKRSISL FVQAALYVMNNIPCESSISVQASYDHFILPQSQGKGQ

SEQ ID NO: 40: Secuencia de aminoácidos de VP35 de la cepa Musoke del virus de Marburg

MWDSSYMQQVSEGLMTGKVPIDQVFGANPLEKLYKRRKPKGTVGLQCSPCLMSKATS
 TDDIIWDQLIVKRTLADLLIPINRQISDIQSTLSEVTTRVHEIERQLHEITPVLKMG
 RTLEAISKGMSEMLAKYDHLVISTGR TTAPAAAFDAYLNEHGVPPPQPAIFKDLGVA
 QQACSKGTMVKNATTTDAADKMSKVLELSEETFSKPNLSAKDLALLLFTHLPGNNTPF
 HILAQVLSKIAYKSGKSGAFLDAFHQILSEGENAQAALTRL SRTFDAFLGVVPPVIR
 VKNFQTVPRPCQKSLRAVPPNPTIDKGWVCVYSSEQGETRALKI

SEQ ID NO: 41: Secuencia de aminoácidos de VP40 de la cepa Musoke del virus de Marburg

MASSSNYN TYMQYLNPPPYADHGANQLIPADQLSNQQGITPNYVGDLNLDDQFKGNV
 CHAFTLEAIIDISAYNERTVKGVPAPWLPLGIMSNFEYPLAHTVAALLTGSYTTITQFT
 HNGQKEVRVNRLGTGIPAHPLRMLREGNQAFIQNMVIPRNFSTNQFTYNLTNLVLSV
 QKLPDDAWRPSKDKLIGNTMHPAVSIHPNLPPIVLPTVKKQAYRQHKNPNNGPLLAI
 SGILHQLRVEKVPEKTSLEFRISLPADMFSVKEGMMKKRGENSEPVVYFQAPENFPLNG
 FNNRQVVLAYANPTLSAV

SEQ ID NO: 42: Secuencia de aminoácidos de L de la cepa Musoke del virus de Marburg

MQHPTQYPDARLSSPIILDQCDLLARSLGLYSHYSHNPKLRNCRIPHHIYRLRNSTA
 LKTFLQNC SILTVPFHSIWDHILTSIQYDAINHVDDEFKYLLPSELVKYANWDNEFLK
 AYLNKILGLDHVFSASARSQCEDEFSPKENPYYWGMLLLVHLSQLARRIKGQRGSLRS
 NWKFIGTDLELEGIADFVIFKVPVKTIIRNAVSLQASKPGLRIWYRDQNLTPYLCDD
 EFIVSVASYECFIMIKDVFIERYNTWEICARAWLEDSGDADYPPLDVLGELYNQGDQ
 IIAMYLEDGFKLIKHLPLCVSCIQTHGIFTPRKYWFQSQMIKSYYDELHDLNLKLQ
 ISDNKAECAQNFIKTIVQAKLTPQQYCELFSLQKHGHPVLYNDVALDKVKKHAQST

KILKPKVMFETFCVFKFIVAKNHYSQGSWYKTTHDLHLTPYLRQHIVSNSFPSQAE
 IYQHLWEWYFVEHEPLESTKIISDLSIFIKDRATAVNQECWDSVFDRLVGYNPPVR
 FQSKRVPEQFLGQADFSLNQILEFAEKLEYLAPSYRNFSFSLKEKELNIGRTFGKLP
 YRVNRVQTLAEALLADGLAKAFPSNMMVVTEREQKEALLHQASWHHNSASIGENAI
 RGASFVTDLEKYNLAFRYEFTRHFIDYCNRCYGVKNLFDWMHFLIPLCYMHVSDFYS
 PPHCVTEDNRNNPPDCANAYHYHLGGIEGLQOKLWTCISCAQITLVELKTKLKLKSS
 VMGDNQCITTLSELPIDAPNDYQENEAELNAAARVAVELAITTGYSGIFLKPEETFEVH
 SGFIYFGKKQYLNQVQLPQSLKTMARCGPLSDSIFDDLQGSLSIGTSFERGTSETR
 HIFPSRWIASFHSMLAINLLNQNHGLGFPLGFENIDISCFKKPLTFSEKLIALITPQVL
 GGLSFLNPEKLFYRNISDPLTSGLFQLKNALEFLEKEELFYILISKKPLGLADASDFV
 MNPLGLNVPGSKEIITFLRQTVRENITITSONRIINSLFHIGSDLEDQORVCEWLLSS
 NPVMSRFAADIFSRTPSGKRLQVLGYLEGTRTLLASRTISLTTEGTMLMKLRELTRN
 RWKSWFSYIDALDDDLSESLEKFTCTVDVANFLRAYSWSDVLKGKRLIGATLPCLLE
 QFEVKWINLSEDLREQFNLSSDSKSTINLLPYDCKELRLEGSNDTELNYVSCALDRK
 VVQKHPSVNRLAWTIGNRAPYIGSRTEKIGYPPLRVNCPAALKEAIEMVSRLLWV
 TQGTADREKLLIPLLSRVNLDYQTVLNLPLTHYSIGNIVHRYNDQYQHSFMANRMS
 NTSTRAIISTNTLGKYAGGGQAAIDSNIIFQNTINLGVAVLDIALSLAKLSSASNVT
 FRLMLNKCCTRHVPSEYLYFDKPLDVLNXYMDNELVYDNDPLCSGKIGRLGRVSR
 TLTLNLVSDIGSYDFPTIAAWTLGETIVGSIFSDESSQSTDPISSGCTKTFVTHFL
 VYPVESIFYAEGANLIVESLSLSRIKSIKNLSDLTFLISSTIRNLSHRSLRILQSTF
 RHELVLTRLAHHIPLISMLGGSAGEKSSSDAVRLELTASYQNFINNFSCLMKKGQS
 SLPVWLYFPSEGQQLKPILKILQRLSDLLSPDKIQKRKILADTCCPIGSFWVYPSKS
 TRTNHYYASLNYWRDKANKVKNTPFSHLINCSPFESSHTSSVSSNQVTSKYIVY
 PENITEINARTRLINYGSTALQGMPTKMPLSEQNLVENCPRPSEGIRFKDNQKITKHD
 QRCEREESFPQMFPEDNMQTPAHIHSSSPFQILIKSLDAHEDFDASKIILNSEINN
 LNLTEYTLNKLTLTPTRTEILDTSPLQSSRYSSRSRERSLLSREQASYLYVDCSNI
 PSISLDPGFRSMQDQNVQMLINTYKRDHACFDSNQFCRFTGVVSSMHYKLYDLLP
 PGKLKKAICLAEGEGSGARLLKWKETDYLFFNTLATDSQQEAEILSGRVIPRMLYN
 IDRLSALLESRRLILNNLTITDITNPLWLDSVIQYLPEDSDILTMDAETTKDETR
 EQLYKTIIVNIWTRTSPNIPKISIIKVFLLDYEGTLEFLMKNAIQYYGQVQLKKPYSSN
 AKNSEWYLCCGKRRIQRLQIDFSDQVGIFLICKAMSRQRQAIPYWLKHIEKNYPASL
 HEFFLTGFPSELESSFCHRYTIPFSEGKALFHKVQSYVRQKQHLHSLMLDYENNSP
 LLDLRNHFICSLRGKITKYNDILKLNLVKAVEKGKNWSQLVEILPNMHSVCIVHV
 DHECSGCEKRLLLKLDFIRNTKIAEQKLLNRVIGYILFFPFGFLKSGSLRA

SEQ ID NO: 43: Secuencia de nucleótidos del vector de vacuna BNSP333-GP de los Ejemplos

AGTTTTTTCAAAAAGGCCTGGATCTATTATTTCAGACAGATCAGACCTCATCGGGTTACGGGAGGATCAAA
 TATACTGCTTAGATGCGTCCAACGGCCCAACCTGTTGGAATGGCCAGGATGGCGGGCTAGAAGGCTTAC
 GGCAGAAGGGCTGGAGTCTAGTCAGCTTATTGATGATAGATAGAGAATCTCAAATCAGGAACACAAGAA
 CCAAAATACTAGCTCAAGGAGACAACCAGGTTTTATGTCCGACATACATGTTGTCGCCAGGGCTATCTC
 AAGAGGGGCTCCTCTATGAATTGGAGAGAAATCAAGGAATGCACCTTCGATATACAGAGCCGTCGAGG
 AAGGGGCATCTAAGCTAGGGCTGATCATCAAGAAAGAAGAGACCATGTGTAGTTATGACTTCCTCATCT
 ATGGAAAAACCCCTTTGTTTAGAGGTAACATATTGGTGCCTGAGTCCAAAAGATGGGCCAGAGTCTCTT
 GCGTCTCTAATGACCAAATAGTCAACCTCGCCAATATAATGTGACAGTGTCCACCAATGCGCTAACAG
 TGGCACAACACTCTCAATCTTTGATCAAACCGATGAGGGATTTTCTGCTCATGTGAGTACAGGCAGTCT
 TTCACTACCTGCTATTTAGCCCAATCTTAAAGGGAAGAGTTTACAAGATTCTGAGCGCTGAAGGGGAGA
 GCTTTCTCCTAGCCATGTCAAGGATAATCTATCTAGATCCTTCTTTGGGAGGGATATCTGGAATGTCCC
 TCGGAAGATTCCATATACGACAGTTCTCAGACCCTGTCTCTGAAGGGTTATCCTTCTGGAGAGAGATCT
 GGTAAAGCTCCCAAGAGTCTGGATTACGCGTGTGTGTCAGAGGGCTGGAAACCCAGATCTTGGAGAGA
 GAACACTCGAGAGCTTCACTCGCCTTCTAGAAGATCCGACCACCTTAAATATCAGAGGAGGGGCCAGTC
 CTACCATTCTACTCAAGGATGCAATCAGAAAGGCTTTATATGACGAGGTGGACAAGGTGGAAAATTAG
 AGTTTCGAGAGGCAATCTGTTGTCCAAGACCCATAGAGATAATTTTATCTCTTCTTAATATCTGTTG
 AGCTCTGTTTCTCGATTTCTCAGTGAGCTATTGAGTTCGTCTTTTTTGGGAATCCCCGAGTCAATCA
 TTGGATTGATACAAAACCTCCGAACGATAAGAAGGCAGTTTAGAAAGAGTCTCTCAAAAACCTTAGAAG
 AATCCTTCTACAACCTCAGAGATCCACGGGATTAGTCCGATGACCCAGACACCTCAGAGGGTTGGGGGGG
 TGTGGCCTTGCTCTTCAGAGAGGGCAGATCTACTTAGGGAGATCTCTTGGGGAAGAAAAGTGGTAGGCA
 CGACAGTTCCTCACCCTTCTGAGATGTTGGGATTACTTCCCAAGTCTCTATTTCTTGCACTTGTGGAG
 CAACAGGAGGAGGCAATCCTAGAGTTTCTGTATCAGTACTCCGCTCTTGTATCAGTCATTTTTTTCAC
 GAGGCCCCCTAAAGGGATACTTGGGCTCGTCCACCTCTATGTGACCCAGCTATTCCATGCATGGGAAA
 AAGTCACTAATGTTTCATGTGGTGAAGAGAGCTCTATCGTTAAAAGAATCTATAAACTGGTTTCACTACTA
 GAGATTCCAAACCTTGGCTCAAGCTCTAATTAGGAACATTATGTCTCTGACAGGCCCTGATTTCCCTCTAG
 AGGAGGCCCCCTGTCTTCAAAAGGACGGGGTCAGCCTTGCAATAGGTTCAAGTCTGCCAGATACAGCGAAG
 GAGGGTATTTCTTCTGTCTGCCCGAACCTCCTCTCTCATATTTCTGTTAGTACAGACACCATGTCTGATT
 TGACCCAAGACGGGAAGAACTACGATTTTCATGTTCCAGCCATTGATGCTTTATGCACAGACATGGACAT
 CAGAGCTGGTACAGAGAGACACAAGGCTAAGAGACTCTACGTTTTCATTGGCACCTCCGATGCAACAGGT
 GTGTGAGACCCATTGACGACGTGACCCTGGAGACCTCTCAGATCTTCGAGTTTCCGGATGTGTGCAAAA
 GAATATCCAGAATGGTTTTCTGGGGCTGTGCCTCACCTCCAGAGGCTTCCCGATATCCGTCTGAGACCAG
 GAGATTTTGAATCTCTAAGCGGTAGAGAAAAGTCTCACCATATCGGATCAGCTCAGGGGCTCTTATACT
 CAATCTTAGTGGCAATTCACGACTCAGGATACAATGATGGAACCATCTTCCCTGTCAACATATACGGCA
 AGGTTTCCCTTAGAGACTATTTGAGAGGGCTCGCAAGGGGAGTATGATAGGATCCTCGATTGTCTCT
 TGACAAGAATGACAAATATCAATATTAATAGACCTCTTGAATTGGTCTCAGGGGTAATCTCATATATTC
 TCCTGAGGCTAGATAACCATCCCTCCTTGTACATAATGCTCAGAGAACCCTCTCTTAGAGGAGAGATAT
 TTTCTATCCCTCAGAAAATCCCCGCCGCTTATCCAACCCTATGAAAGAAGGCAACAGATCAATCTTGT
 GTTATCTCCAACATGTGCTACGCTATGAGCGAGAGATAATCACGGCGCTCTCCAGAGAATGACTGGCTAT
 GGATCTTTTCAGACTTTAGAAGTGCCAAAATGACGTACCTATCCCTCATTACTTACCAGTCTCATCTTC
 TACTCCAGAGGGTTGAGAGAAACCTATCTAAGAGTATGAGAGATAAACCIGCGACAATTGAGTTCTTTGA
 TGAGGCAGGTGCTGGGCGGGCACGGAGAAGTACCTTAGAGTCAAGACGACAACATTCAACGACTGCTAA
 AAGACTCTTTACGAAGGACAAGATGGGTGGATCAAGAGGTGCGCCATGCAGCTAGAACCATGACTGGAG
 ATTACAGCCCCAACAGAAGGTGTCCCGTAAGGTAGGATGTTCAGAAATGGGTCTGCTCTGCTCAACAGG
 TTGCAGTCTCTACCTCAGCAAACCCGGCCCCGTGTCTCGGAGCTTGACATAAGGGCCCTCTCTAAGAGGT
 TCCAGAACCCTTTGATCTCGGGCTTGAGAGTGGTTTCAAGTGGGCAACCGGTGCTCATTATAAGCTTAAGC
 CTATTCTAGATGATCTCAATGTTTTCCCATCTCTCTGCTTGTAGTTGGGGACGGGTGAGGGGGGATAT
 CAAGGGCAGTCTCAACATGTTTCCAGATGCCAAGCTTGTGTTCAACAGTCTTTTAGAGGTGAATGACC
 TGATGGCTTCCGGAACACATCCACTGCCTCCTTCAGCAATCATGAGGGGAGGAAATGATATCGTCTCCA
 GAGTGATAGATCTTGACTCAATCTGGGAAAAACCGTCCGACTTGAGAACTTGGCAACCTGGAAATACT
 TCCAGTCAAGTCCAAAAGCAGGTCAACATGTCTATGACCTCATTATTTGCGATGCAGAAGTTACTGACA
 TTGATCTATCAACCGGATCACCTGTAAATGTCCGATTTTGCATTGTCTATAGATGGACCACTTATT
 TGGTCTTCAAAACTTATGGGACTATGCTAGTAAATCCAACTACAAGGCTATTCAACACCTGTCAAGAG
 CGTTCCCTCGGTACAGGGTTTATCACCCAAGTAACCTTCGTCTTTTCACTGAGCTCTACCTCCGAT
 TCTCCAAACGAGGGGAAGTTTTTTCAGAGATGCTGAGTACTTGACCTCTTCCACCCTTCGAGAAATGAGCC
 TTGTGTTATTCAATTGTAGCAGCCCCAAGAGTGAGATGCAGAGAGCTCGTTCCCTTGAACATACAGGATC
 TTGTGAGAGGATTTCTTGAAGAAATCATATCAAATCCTTACAATGAGATGATCATAACTCTGATTGACA
 GTGATGTAGAATCTTTCTAGTCCACAAGATGGTTGATGATCTTGAGTTACAGAGGGGAACCTCTGTCTA
 AAGTGGCTATCATATAGCCATCATGATAGTTTCTCCAACAGAGTCTTCAACGTTTCCAAACCCCTAA
 CTGACCCCTCGTTCTATCCACCGTCTGATCCCAAAATCCTGAGGCACCTTCAACATATGTTGCAGTACTA
 TGATGTATCTATCTACTGCTTTAGGTGACGTCCCTAGCTTCGCAAGACTTCACGACCTGTATAACAGAC
 CTATAACTTATTACTTCAGAAAGCAAGTCATTTCGAGGGAACGTTTATCTAICTTGGAGTTGGTCCAACG

CCATACTCTAATGACAACTCACAAaATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCAAACCTCAGATTTTTGGC
 CGGAACCTATGACATGTTTTCTCCCGGATTGAGCATCTATATTCAGCAATCAGAGTGGGCACAGTTGT
 CACTGCTTATGAAGACTGTTTCCAGGACTGGTATCATTACTGGGTTTCATAAAACAAATCAATCTCÁCCGC
 TAGAGAGGCAATACTATATTTCTCCACAAGAACTTTGAGGAAGAGATAAGAAGAATGTTTGAGCCAGG
 GCAGGAGACAGCTGTTTCTCCTCCTCTTATTTTCCACTTCCGTTTACTAGGCTTGAGTGGGAAATCTCC
 TTATTCATCAAATGCTGTTGGTCACGTGTTCAATCTCATTCACTTTGTAGGATGCTATATGGGTCAAGT
 CAGATCCCTAAATGCAACGGTTATTGCTGCATGTGCTCCTCATGAAATGCTGTGTTCTAGGGGGCTATCT
 GGGAGAGGAATTTCTTCGGGAAAGGGACATTTGAAAGAAGATTCTTCAGAGATGAGAAAGAACTTCAAGA
 ATACGAGGCGGCTGAACTGACAAAGACTGACGTAGCACTGGCAGATGATGGAAGTGTCAACTCTGACGA
 CGAGGÁCTACTTTTTCAGGTGAAACCAGAACTCCGGAGGCTGTTTATCTCGAATCATGATGAATGGAGG
 TCGACTAAAGAGATCTCACATACGGAGATATGTCTCAGTCAGTTCCAATCATCAAGCCCGTCCAAACTC
 ATTCGCCGAGTTTCTAAACAAGACATATTCGAGTGACTCATAAcatgaaaaaaactaacccccctcccg
 taagCCGCCACCatgGGTGTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAGGACATCATTCT
 TTTCTTTGGGTAATTATCCTTTTTCCAAAGAACATTTCCATCCCCTTGGAGTCAATCCACAATCAATTGAGATCA
 TTACAGGTTAGTGATGTGACAAACTAGTTTGTGCTGACAAACTGTCTATCCACAATCAATTGAGATCA
 GTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTC
 AGGTCCGGTGTCCACCAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAACCTGCTACAATCTT
 GAAATCAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTTCGGGGCTTCCCCCGG
 TGCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCATAAAGAGGGT
 GCTTTCTTCTGTATGATCGACTTGTCTCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTTTCGCTGAAGGTGTC
 GTTGCATTTCTGATCTGCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGGTC
 AATGCAACGGAGGACCCGCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATTAGATATCAGGCTACCGGTTTTGGA
 ACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACCTTGAATCAAGATTACACA
 CCACAGTTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAA
 CTAATTTGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCTTCTGGGAAacTAAAAAA
 AACCTCACTAGAAAAaTTCGCAGTGAAGAGTTgTCTTTACAGTTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATC
 AGTGGTCAGAGTCCGGCGCAACTTCTTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACCTGAAGACCACAAAATC
 ATGGCTTCAGAAAATTCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTGCGAT
 CTGACAACCCCTGCCACAATCTCCACGAGTCTTCAACCCCCCACAACCAAAACCAGGTCCGGACAACAGC
 ACCCACAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACAACATCACCCGAGA
 ACAGACAACGACAGCACAGCcTCCGACACTCCcTCTGCCACGACcGCAGCCGGACCCCCAAAAGCAGAG
 AACACCAACGAGCAAGAGCACTGÁCTTCTTGACCCCGCCACCACAACAAGTCCCCAAAACCACAGC
 GAGACCGCTGGCAACACAACACTCATCACAAGATACCGGAGAAGAGTGGCAGAGCGGGAAGCTA
 GGCTTAATTACCAATACTATTGCTGGAGTGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGAAGAACTCGAAGAGAA
 GCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCT
 GCAATCGGACTGGCTGGATACCATATTTCCGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTAATG
 CACAATCAAGATGGTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTG
 TTCTGAGAGCCACAACCTGAGCTACGCACCTTTTCAATCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCTG
 CAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTCTGGGACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAG
 AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTGATAAAACCTTCCGGACCAGGGGGAC
 AATGACAAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTGTAAAT
 GCAGTTATCGCTTATTCTGTATATGCAAAATTTGTCTTTTAGGAGCTAGCCATGAAAAAACATAACACC
 CCTCCTTTCCGAACCATCCCAAACTGAGCAAGATCTTGTCAATCTAGTGCTIATTAGAGCCGCTCTGG
 CCGATCTTGAGATGGCTGAAGAAACTGTTGATCTGATCAATAGAAATATCGAAGACAATCAGGCTCATC
 TCCAAGGGGAACCCATAGAGGTGGACAATCTCCCTGAGGATATGGGGCGACTTCACCTGGATGATGGAA
 AATCGCCCAACCATGGTGAGATAGCCAAGGTGGGAGAAGGCAAGTATCGAGAGGACTTTCAGATGGATG
 AAGGAGAGGATCCTAGCTTCTGTTCCAGTCATACCTGGAAAATGTTGGAGTCCAAATAGTCAGACAAA
 TGAGGTCAGGAGAGAGATTTCTCAAGATATGGTCACAGACCGTAGAAGAGATTATCTCTATGTCGCGG
 TCAACTTTCCCAACCCCTCCAGGAAAGTCTTCAGAGGATAAATCAACCCAGACTACTGGCCGAGAGCTCA
 AGAAGGAGACAACACCCACTCCTTCTCAGAGAGAAAGCCAATCAICGAAAGCCAGGATGGCGGCTCAAA
 TTGCTTCTGGCCCTCCAGCCCTTGAATGGTCGGCTACCAATGAAGAGGATGATCTATCAGTGGAGGCTG
 AGATCGCTCACCAGATTGCAGAAAGTTTCTCAGAAAATATAAGTTTCCCTCTCGATCCTCAGGGATAC
 TCTTGATATAATTTTGAGCAATTGAAAAATGAACCTTGATGATATAGTTAAAGAGGCAAAAAATGTACCAG
 GTGTGACCCGTTTAGCCCATGACGGGTCCAAACTCCCCCTAAGATGTGTACTGGGATGGGTGCGCTTTGG
 CCAACTCTAAGAAATTCCAGTTGTTAGTCGAATCCGACAAGCTGAGTAAAATCATGCAAGATGACTTGA
 ATCGCTATACATCTTGCTAACCGAACCTCTCCCCCTCAGTCCCTCTAGACAATAAAATCCGAGATGTCCC
 AAAGTCAACATGAAAAAAACAGGCAACACCACTGATAAAATGAACCTCCTACGTAAGATAGTGAAAAAC
 CGCAGGGACGAGGACACTCAAAAATCCTCTCCCGCTCAGCCCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTT
 CCACCCCTGAATACGTCCCGCTGAAAGAACTTACAGGCAAGAAGAACATGAGGAACTTTTGTATCAAC
 GGAAGGGTTAAAGTGTGTAGCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCCTGCGGCACATTCTGAAATCATTC
 GACGAGATATATTCTGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAGTGGTTATTGGACTGGCTTTGTCA

GGATCTCCAGTCCCTGAGGGCCTGAACTGGGTATACAAATTGAGGAGAACCCTTTATCTTCCAGTGGGCT
GATTCAGGGGCCCTCTTGAAGGGGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACT
GAGTTCGTTCGATTGCAAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTATATCCAGGGCAGAGTCTGGTGTATC
AACATGAACCCGAGAGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCTTCCAGACACAAAGGTCCGAAGAGGAC
AAAGATTCTCTCTGCTTCTAGAATAATCAGATTATATCCCGCAAATTTATCACTTGTTTACCTCTGGA
GGAGAGAACATATGGGCTCAACTCCAACCTTGGGAGCAATATAACAAAAACATGTTATGGTGCCATT
AAACCGCTGCATTTCAATCAAAGTCAAGTTGATTACCTTTACATTTTGTATCCTCTTGGATGTGAAAAAA
CTATTAAACATCCCTCAAAAGACccccgggAAAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGG
TTTTTCCATTGTGTTTTTGGGAAATTCCTTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGTCCGA
TTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCTAG
GGTTCCTCTACATGGAACCTAAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAGTGAACGGGTTCACCTGACACAG
GCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTTGGTTATGTCAACCCACGTTCAAAAGAAAGC
ATTTCCGCCCAACACCAGATGCAITGATAGAGCCGCGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATG
AAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACCGCTGGCTTGAACCTGTAAAAACCAAGGAGTCTC
TCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCC
CTAGCGGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACACCATTT
GGATGCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCAT
CCAAAGGGAGTGAGACTTGC GGCTTTGTAGATGAAGAGGGCTATATAAGTCTTTAAAGGAGCATGCA
AACTCAAGTTATGTGGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCTCGATGCAACATCAA
ATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCGATAAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGC
ACCTTGTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACATAGAGTCCATCATGACAA
CCAAGTCAGTGAGTTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAAAACTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAAGCATATA
CCATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCgagACTTGGAAATGAGATCC
TCCCTTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCTATCCTCATGTGAACGGGTGTTTTTTCAATG
GTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCAGAGATGCAATCATCCCTCTCCAGCAACATA
TGGAGTTGTTGGAATCTCGGTTATCCCCCTTGTGCACCCCTGGCAGACCCGCTACCGTTTTTCAAGG
ACGGTGACGAGGCTGAGGATTTTTGTTGAAGTTACCTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTG
ACTTGGGTCTCCCGAACCTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCCTTGATGTTGA
TAATTTTCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTACGCAACACAATCTCAGAGGGA
CAGGGAGGGAGGTGTCTAGTCACTCCCCAAAGCGGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCACACAAGAGTG
GGGTGAGACGACCATGTAatttaattaaCGTCTTTTCAACGATCCAAGTCCatgaaaaaaactaacacc
cctcccgtacctagctTATAAAGTGTGGGTCTATCTAAGCTTTTTCAGTCGAGAAAAAACATTAGATCA
GAAGAACAACCTGGCAACACTTCTCAACCTGAGACTTACTTCAAGATGCTCGATCCTGGAGAGGTCTATG
ATGACCTATTGACCCAATCGAGTTAGAGGCTGAACCCAGAGGAACCCCATTTGTCCCCAACATCTTGA
GGAACCTCTGACTACAATCTCAACTCTCCTTTGATAGAAGATCCTGCTAGACTAATGTTAGAATGGTTAA
AAACAGGGGAATAGACCTTATCGGATGACTCTAACAGACAATTGCTCCAGGTCTTTCAGAGTTTTTGAAAG
ATTATTTCAAGAAGGTAGATTTGGGTTCTCTCAAGGTGGGCGGAATGGCTGCACAGTCAATGATTTCTC
TCTGGTTATATGGTGGCCACTCTGAATCCAACAGGAGCCGGAGATGTATAACAGACTTGGCCCATTTCT
ATTCCAAGTCTGCTCCCCATAGAGAAGCTGTTGAATCTCAGCTAGGAAATAGAGGGCTGAGAATCCCCC
CAGAGGGAGTGTAAAGTTGCCCTGAGAGGGTTGATTATGATAATGCATTGGAAGGTATCTTGCCAACA
CGIATTCCTCTTACTTGTCTTCCATGTAATCACCTTATACATGAACGCCCTAGACTGGGATGAAGAAA
AGACCATCTAGCATTATGGAAAGATTTAACCTCAGTGGACATCGGGAAGGACTTGGTAAAGTTCAAAG
ACCAAATATGGGGACTGCTGATCGTGACAAAGGACTTTGTTTACTCCCAAAGTTCCAATTGTCTTTTTG
ACAGAAACTACACACTTATGCTAAAAAGATCTTTTCTTGCTCGCTTCAACTCCTTAATGGTCTTGCTCT
CTCCCCCAGAGCCCCGATACTCAGATGACTTGATATCTCAACTATGCCAGCTGTACATTGCTGGGGATC
AAGTCTTGTCTAIGTGTGGAACTCCGGCTATGAAGTCATCAAAATATTGGAGCCATATGTCGTGAATA
AAGACAAGGTAAAGTCAACTTGAAGAGACGTTCCGGTCCCTGTGCAAGAAGGTTCCTTAGGGCTCTGGATC
AATTCGACAACATACATGACTTGGTTTTTGTGTTTGGCTGTTACAGGCATTGGGGGCACCCATATATAG
ATTATCGAAAGGGTCTGTCAAACTATATGATCAGGTTACCTTAAAAAAATGATAGATAAGTCTTACC
AGGAGTGTCTTAGCAAGCGACCTAGCCAGGAGGATCCTTAGATGGGGTTTTGATAAGTACTCCAAGTGGT
ATCTGGATTCAAGATTCTAGCCCGAGACCACCCCTTGACTCCTTATATCAAAACCCAAACATGGCCAC
CCAAACATATTGTAGACTTGGTGGGGGATACATGGCACAAGCTCCCGATCACGCAGATCTTTGAGATTCT
CTGAATCAATGGATCCGTCAGAAATATTGGATGACAAATCACATTCTTTCACCAGAACGAGACTAGCTT
CTTGGCTGTCTAGAAACCGAGGGGGGCTGTTCTTAGCGAAAAAGTTATTATCACGGCCCTGTCTAAGC
CGCTGTCTCAATCCCGAGAGTTTCTGAGGTCTATAGACCTCGGAGGATTGCCAGATGCAAGCTTGATAA
TTGGCCTCAAGCCAAAGGAACGGGAATTGAAGATTGAAGGTCGATTCTTTGCTCTAATGTCTATGGAATC
TAAGATTGTATTTTGTCTCACTGAAAACTCTTGGCCAACTACATCTTGCCACTTTTTGACGCGCTGA
CTATGACAGACAACCTGAACAAGGTGTTTAAAAAGCTGATCGACAGGGTCACCGGGCAAGGGCTTTTTGG
ACTATTCAAGGGTCACATATGCATTTACCTGGACTATGAAAAGTGGACAACCATCAAAGATTAGAGT
CAACAGAGGATGTATTTTCTGTCTAGATCAAGTGTTTGGATTGAAGAGAGTGTTTTCTAGAACACACG

ACACCTCAGTGTTCAAAGGGTAGCCTGTAATTCTAGCCTGAGTCTGTCATCTCACTGGATCAGGTTGA
TTTACAAGATAGTGAAGACTACCAGACTCGTTGGCAGCATCAAGGATCTATCCAGAGAAGTGGAAAGAC
ACCTTCATAGGTACAACAGGTGGATCACCTAGAGGATATCAGATCTAGATCATCCCTACTAGACTACA
GTTGCCGTGTAACCGGATACTCCTGGAAGCCTGCCCATGCTAAGACTCTTGTTGTGATGTATCTTGAAAA
AAACAAGATCCTAAATCTGAACCTTTGGTTGTTTGATTGTTTTCTCAtttttgttgtttatttgttaa
gcgt

SEQ ID NO: 44: Secuencia de nucleótidos del vector de vacuna BNSP333-GP_{GCD} de los Ejemplos

ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAAAAAAGACACATTGTCAATTGCAAAGCAAAAATGTAAACACCCCTAC
 AATGGATGCCGACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCTGAGATTATCGT
 GGATCAATATGAGTACAAGTACCCTGCCATCAAAGATTTGAAAAAGCCCTGTATAACCCTAGGAAAGGC
 TCCCGATTTAAATAAAGCATACAAGTCAGTTTTTGTGAGGCATGAGCGCCGCCAAACTTAATCCTGACGA
 TGTATGTTCTATTTTGGCAGCGGCAATGCAGTTTTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGACCAGCTA
 TGGAAATTGTGATTGCACGAAAAGGAGATAAGATCACCCAGGTTCTCTGGTGGAGATAAAACGTACTGA
 TGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAACGACAAGAGACCCCACTGTCCCTGAGCATGC
 GTCCTTAGTTCGGTCTTCTCTTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCCGGGCAAAACACTGGTAACTA
 TAAGACAAACATTGCAGACAGGATAGAGCAGATTTTTGAGACAGCCCCCTTTTGTAAAAATCGTGGAAAC
 CCATACTCTAATGACAACCTCACAAaATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCAAACCTTCAGATTTTTGGC
 CGGAACCTATGACATGTTTTTCTCCCGGATTGAGCATCTATATTAGCAATCAGAGTGGGCACAGTTGT
 CACTGCTTATGAAGACTGTTTCCAGGACTGGTATCATTACTGGGTTTATAAAACAAATCAATCTCACCCGC
 TAGAGAGGCAATACTATATTTCTTCCACAAGAACTTTGAGGAAGAGATAAGAAGAATGTTTGAGCCAGG
 GCAGGAGACAGCTGTTCTCACTCTTATTTTCATCCACTTCCGTTTCACTAGGCTTGAGTGGGAAATCTCC
 TTATTCATCAAATGCTGTGTTGGTCACGTGTTCAATCTCATTCACTTTGTAGGATGCTATATGGGTCAAGT
 CAGATCCCTAAATGCAACGGTTATTGCTGCATGTGCTCCTCATGAAATGTCTGTTCTAGGGGGCTATCT
 GGGAGAGGAATTCTTCGGGAAAGGGACATTTGAAAGAAGATTCTTCAGAGATGAGAAAGAACCTCAAGA
 ATACGAGGCGGCTGAACTGACAAAGACTGACGTAGCACTGGCAGATGATGGAACGTCAACTCTGACGA
 CGAGGACTACTTTTCAGGTGAAACCAGAAGTCCGGAGGCTGTTTATACTCGAATCATGATGAATGGAGG
 TCGACTAAAGAGATCTCACATACGGAGATATGTCTCAGTCAGTTCCAATCATCAAGCCCGTCCAAACTC
 ATTCGCCGAGTTTCTAAACAAAGACATATTCGAGTGACTCATAAcatgaaaaaaactaacacccctcccG
 TACGCCGCCACCcatgGGTGTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAGGACATCATTC
 TTTCTTTGGGTAAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCACA
 TTACAGGTTAGTGATGTGACAAACTAGTTTGTGCTGACAAACTGTATCCACAATCAATTGAGATCA
 GTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTC
 AGGTCCGGTGTCCACCAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAACGTCTACAATCTT
 GAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTCCGGGGCTTCCCCCGG
 TGCCGGTATGTGACAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCATAAAGAGGGT
 GCTTTCTTCTGTATGATCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACCAGGAACGACTTTGCTGAAGGTGTC
 GTTGCAATTTCTGATACTGCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGGTC
 AATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATTAGATATCAGGCTACCGGTTTTGGA
 ACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTCA
 CCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAA
 CTAATTTGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAAaCTAAAAAA
 AACCTCACTAGAAAAaTTGCGAGTGAAGAGTTgTCTTTCAAGTTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATC
 AGTGGTCAGAGTCCGGCGCAACTTCTTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACCTGAAGACCACAAAATC
 ATGGCTTCAGAAAATTCTCTGCAATGGTTCAAGTGACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTGCGAT
 CTGACAACCCCTGCCACAATCTCCACGAGTCTTCAACCCCCCACAACCAACCAGGTCCGGACAACAGC
 ACCCACAAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACAACATCACCGCAGA
 ACAGACAACGACAGCACAGCCcTCCGACACTCCcTCTGCCACGACcGCAGCCGGACCCCCAAAAGCAGAG
 AACACCAACACGAGCAAGAGCACTGACTTCTGGACCCCGCCACCACAACAAGTCCCCAAAACACAGC
 GAGACCGCTGGCAACAACAACACTCATACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGCAGCGGGAAGCTA
 GGCTTAATTACCAATACTATTGCTGGAGTGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGAAGAACTCGAAGAGAA
 GCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCT
 GCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATTTCCGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTAATG
 CACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTG
 TTCCTGAGAGCCACAACCTGAGCTACGCACTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCTG
 CAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTCTGGGACCGGACTGCTGTATCGAACACATGATTGGACCAAG
 AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTGTATAAAACCCCTTCCGGACCGAGGGGAC
 AATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTGTAATT

GCAGTTATCGCTTTATTCTGTATATGCgttaacAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTACGCAACACAAT
 CTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCTAGTCACTCCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCA
 CACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTAAgCTAGCCATGAAAAAACTAACACCCCTCCTTTTCGAACC
 ATCCCAACATGAGCAAGATCTTTGTCAATCCTAGTGCTATTAGAGCCGGTCTGGCCGATCTTGAGATG
 GCTGAAGAACTGTTGATCTGATCAATAGAAATATCGAAGACAATCAGGCTCATCTCCAAGGGGAACCC
 ATAGAGGTGGACAATCTCCCTGAGGATATGGGGCGACTTCACCTGGATGATGGAAAATCGCCCCAACCAT
 GGTGAGATAGCCAAGGTGGGAGAAGGCAAGTATCGAGAGGACTTTTCAATGGATGAAGGAGAGGATCCT
 AGCTTCTGTTCAGTCATACCTGGAAAATGTTGGAGTCCAAATAGTCAGACAAATGAGGTGAGGAGAG
 AGATTCTCAAGATATGGTCACAGACCGTAGAAGAGATTATATCCTATGTCGCGGTCAACTTTCCCAAC
 CCTCCAGGAAAGTCTTCAGAGGATAAATCAACCCAGACTACTGGCCGAGAGCTCAAGAAGGAGACAACA
 CCCACTCCTTCTCAGAGAGAAAGCCAATCATCGAAAGCCAGGATGGCGGCTCAAAATTGCTTCTGGCCCT
 CCAGCCCTTGAATGGTGGCTACCAATGAAGAGGATGATCTATCAGTGGAGGCTGAGATCGCTCACCAG
 ATTGCAGAAAGTTTCTCCAAAAATATAAGTTTCCCTCTCGATCCTCAGGGATCTCTTGATAATTTT
 GAGCAATTGAAAATGAACCTTGATGATATAGTTAAAGAGGCAAAAAATGTACCAGGTGTGACCCGTTTA
 GCCCATGACGGGTCCAAACTCCCCCTAAGATGTGTACTGGGATGGGTGCTTTGGCCAACTCTAAGAAA
 TTCCAGTTGTTAGTTCGAATCCGACAAGCTGAGTAAAATCATGCAAGATGACTTGAATCGCTATACATCT
 TGCTAACCGAACCTCTCCCTCAGTCCCTCTAGACAATAAAATCCGAGATGTCCCAAAGTCAACATGAA
 AAAAACAGGCAACACCACATGATAAAATGAACCTCTACGTAAGATAGTGAAAAACCGCAGGGACGAGGA
 CACTCAAAAATCCTCTCCCGCTCAGCCCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCTGAATA
 CGTCCCGCTGAAAAGAACTTACAGGCAAGAAGAACATGAGGAACCTTTTGATCAACGGAAGGGTTAAAGT
 GTGTAAGCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCTTGGGCACATTCTGAAATCATTTCGACGAGATATATTC
 TGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAGTGGTTATTGGACTGGCTTTGTCAGGATCTCCAGTCCC
 TGAGGGCCTGAACTGGGTATACAAATTGAGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGGTGATTCCAGGGGCC
 TCTTGAAGGGGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCTGTCGGATT
 GCAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTCAATCCAGGGCAGAGTCTGGTGTATCAACATGAACCCGAG
 AGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCTTCAGACACAAAGGTCCGAAGAGGACAAAGATTCTCTCT
 GCTTCTAGAATAATCAGATTATATCCCGCAAATTTATCACTTGTTTACCTCTGGAGGAGAGAACATATG
 GGCTCAACTCCAACCCCTTGGGAGCAATATAACAAAAACATGTTATGGTGCCATTAAACCGCTGCATTT
 CATCAAAGTCAAGTTGATTACCTTTACATTTTGATCCTCTTGGATGTGAAAAAACTATTAAATCCCT
 CAAAAGACccccgggAAAGATGGTTCCCTCAGGCTCTCTGTTTGTACCCCTCTGCTGTTTTCATTGTGT
 TTTGGGAAATTCCCTATTACACGATACAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGTCCGATTGACATACATCAC
 CTCAGCTGCCCAAACAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTGAGGGTTCTCTACATG
 GAACCTAAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAGTGAACGGGTCACTTGCACAGGCGTTGTGACGGAG
 GCTGAAACCTACACTAATCTCGTTGGTTATGTCAACACACGTTCAAAGAAAGCATTTCGCCCCAACA
 CCAGATGCATGTAGAGCCGCTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACAC
 AATCCGTACCCTGACTACCGCTGGCTTCGAACGTGAAAAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCT
 CCAAGTGTGGCAGATTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGC
 TCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCTCAACACGATTACACCATTTGGATGCCGAGAAAT
 CCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTACCATAATAGTAGGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAG
 ACTTGGCGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGT
 GGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCTCGATGCAACATCAAATGAAACCAATGG
 TGCCCTCCCGATAAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTGTAGAG
 GAGTTGGTCAAGGAGAGAGAGAGTGTCTGGATGCCTAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAGTGAGT
 TTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAAAACCTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAG
 ACCTTGATGGAAGCAGATGCTCACTACAAGTCAGTCTgagACTTGGaagGAGATCCTCCCTTCAAAGGG
 TGTTTAAGAGTTGGGGGAGGTGTCTATCTCATGTGAACGGGTGTTTTTCAATGGTATATATTAGGA
 CCTGACGGCAATGTCTTAATCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGAA
 TCCTCGGTTATCCCCCTTGTGCACCCCTGGGACAGCCGCTCTACCGTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCT
 GAGGATTTTGTGAAAGTTCACCTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCG
 AACTGGGGGAAGTATGTAATTACTGAGTGCAGGGGCTCTGACTGCCTTGATGTTGATAATTTTCTGATG
 ACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTACGCAACAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTG
 TCAGTCACTCCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGA
 CTGTAatttaattaaCGTCCTTTCAACGATCCAAGTCCatgaaaaaaactaacacccctcccgtacctag
 cTTATAAAGTGTCTGGGTCACTAAGCTTTTTCAGTGCAGAAAAAAACATTAGATCAGAAGAACAACCTGGC
 AACACTTCTCAGCTGAGACTTACTTCAAGATGCTCGATCCTGGAGAGGTCTATGATGACCTATTGAC
 CCAATCGAGTTAGAGGCTGAACCCAGAGGAACCCCATTTGTCCCCAACATCTTGAGGAACCTCTGACTAC
 AATCTCAACTCTCCTTTGATAGAAGATCTCTGCTAGACTAATGTTAGAATGGTTAAAAACAGGGAATAGA
 CCTTATCGGATGACTCTAACAGACAATTGCTCCAGGTCTTTTCAGAGTTTTGAAAGATTATTTCAAGAAG
 GTAGATTGGGTTCTCTCAAGGTGGGCGGAATGGCTGCACAGTCAATGATTTCTCTCTGGTTATATGGT
 GCCCACTCTGAATCCAACAGGAGCCGAGATGTATAACAGACTTGGCCCATTTCTATTCCAAGTCGTCC
 CCCATAGAGAAGCTGTTGAATCTCACGCTAGGAAATAGAGGGCTGAGAATCCCCCAGAGGGAGTTTA

AGTTGCCTTGAGAGGGTTGATTATGATAATGCATTGGAAGGTATCTTGCCAACACGTATTCTCTTAC
 TTGTTCTTCCATGTAATCACCTTATACATGAACGCCCTAGACTGGGATGAAGAAAAGACCATCTAGCA
 TTATGGAAAGATTTAACCTCAGTGGACATCGGGAAGGACTTGGTAAAGTTCAAAGACCAAATATGGGGA
 CTGCTGATCGTGACAAAGGACTTTGTTTACTCCCAAAGTTCCAATTGTCTTTTTTGACAGAACTACACA
 CTTATGCTAAAGATCTTTCTTGCTCGCTTCAACTCCTTAATGGTCTTGCTCTCTCCCCAGAGCCC
 CGATACTCAGATGACTTGATATCTCAACTATGCCAGCTGTACATTGCTGGGGATCAAGTCTTGCTATG
 TGTGGAACTCCGGCTATGAAGTCATCAAAATATTGGAGCCATATGTCGTGAATAGTTTAGTCCAGAGA
 GCAGAAAAGTTTAGGCTCTCATTCACTTCTTGGGAGACTTTCTGTATTTATAAAAGACAAGGTAAGT
 CAACTTGAAGAGACGTTCCGGTCCCTGTGCAAGAAGGTTCTTTAGGGCTCTGGATCAATTCGACAACATA
 CATGACTTGGTTTTTGTGTTTGGCTGTTACAGGCATTGGGGGCACCCATATATAGATTATCGAAAGGGT
 CTGTCAAACTATATGATCAGGTTACCTTAAAAAATGATAGATAAGTCCACCAGGAGTGCTTAGCA
 AGCGACCTAGCCAGGAGGATCCTTAGATGGGGTTTTGATAAGTACTCCAAGTGGTATCTGGATTCAAGA
 TTCCTAGCCCCGAGACCACCCCTTGACTCCTTATATCAAAACCCAAACATGGCCACCCAAACATATTGTA
 GACTTGGTGGGGGATACATGGCACAAGTCCCGATCACGCAGATCTTTGAGATTCTGAATCAATGGAT
 CCGTCAGAAATATTGGATGACAAATCACATTCTTACCAGAACGAGACTAGCTTCTGGCTGTCAGAA
 AACCGAGGGGGCCTGTTCTAGCGAAAAAGTTATTATCACGGCCCTGTCTAAGCCGCTGTCAATCCC
 CGAGAGTTCTGAGGTCTATAGACCTCGGAGGATTGCCAGATGAAGACTTGATAATTGGCTCAAGCCA
 AAGGAACGGGAATTGAAGATTGAAGTCCGATTCTTTGCTCTAATGTCTAGGAATCTAAGATTGATTTT
 GTCATCACTGAAAACTCTTGGCCAACTACATCTTGCCACTTTTTGACGCGCTGACTATGACAGACAAC
 CTGAACAAGGTGTTTTAAAAAGCTGATCGACAGGGTCACCGGGCAAGGGCTTTTGACTATTCAAGGGTC
 ACATATGCATTTCACCTGGACTATGAAAAGTGAACAACCATCAAAGATTAGAGTCAACAGAGGATGTA
 TTTTCTGTCTAGATCAAGTGTGGATTGAAGAGAGTGTCTTAGAACACACGAGTTTTTTCAAAG
 GCCTGGATCTATTATTCAGACAGATCAGACCTCATCGGGTTACGGGAGGATCAAAATACTGCTTAGAT
 GCGTCCAACGGCCCAACCTGTTGGAATGGCCAGGATGGCGGGCTAGAAGGCTTACGGCAGAAGGGCTGG
 AGTCTAGTCAGCTTATTGATGATAGATAGAGAATCTCAAATCAGGAACACAAGAACCAAAATACTAGCT
 CAAGGAGACAACAGGTTTTATGTCCGACATACATGTTGTGCGCCAGGGCTATCTCAAGAGGGGCTCCTC
 TATGAATTGGAGAGAATATCAAGGAATGCATTTCGATATACAGAGCCGTCGAGGAAGGGGCTCTAAG
 CTAGGGCTGATCATCAAGAAAGAAGAGACCATGTGTAGTTATGACTTCCTCATCTATGGAAAAACCCCT
 TTGTTTAGAGGTAAACATATTGGTGCCTGAGTCCAAAAGATGGGCCAGAGTCTCTTGGCTCTCTAATGAC
 CAAATAGTCAACCTCGCCAATATAATGTGACAGTGTCCACCAATGCGCTAACAGTGGCACAACACTCT
 CAATCTTTGATCAAAACCGATGAGGGATTTCTGCTCATGTCTAGTACAGGCAGTCTTCACTACCTGCTA
 TTTAGCCCAATCTTAAAGGGAAGAGTTTACAAGATTCTGAGCGCTGAAGGGGAGAGCTTTCTCCTAGCC
 ATGTCAGGATAATCTATCTAGATCTTCTTTGGGAGGGATATCTGGAATGTCCCTCGGAAGATTCCAT
 ATACGACAGTTCTCAGACCCCTGTCTCTGAAGGGTTATCCTTCTGGAGAGAGATCTGGTTAAGCTCCCAA
 GATCCCTGGAGTACCGCGTTGTGTCAAGAGGCTGGAAACCCAGATCTTGAGAGAGAACACTCGAGAGC
 TTACTCGCCTTCTAGAAGATCCGACCACCTTAAATATCAGAGGAGGGGCCAGTCTTACCATTCTACTC
 AAGGATGCAATCAGAAAGGCTTTATATGACGAGGTGGACAAGGTGGAAAATTCAGAGTTTCGAGAGGCA
 ATCCTGTGTCCAAGACCCATAGAGATAATTTATACTCTTCTTAATATCTGTGTAGCCTCTGTTTCT
 CGATTCTCAGTGAGCTATTAGTTCGTCTTTTTTGGGAATCCCGAGTCAATCATTTGGATTGATACAA
 AACTCCCGAACGATAAGAAGGCAGTTTAGAAAGAGTCTCTCAAAAACTTTAGAAGAATCCTTCTACAAC
 TCAGAGATCCACGGGATTAGTCGGATGACCCAGACACCTCAGAGGGTTGGGGGGTGTGGCCTTGCTCT
 TCAGAGAGGGGATCTACTTAGGGAGATCTCTTGGGGAAGAAAAGTGGTAGGCACGACAGTTCTCTCAC
 CTTCTGAGATGTTGGGATTACTTCCCAAGTCCCTCTATTCTTGCACTTGTGGAGCAACAGGAGGAGGC
 AATCCTAGAGTTTTCTGTATCAGTACTCCCGTCTTTGATCAGTCAATTTTTTACAGAGGCCCCCTAAAG
 GGATACTTGGGCTCGTCCACCTCTATGTGACCCAGCTATTCCATGCATGGGAAAAAGTCACTAATGTT
 CATGTGGTGAAGAGAGCTCTATCGTTAAAAGAATCTATAAACTGGTTTCACTAGAGATTCCAATTTG
 GCTCAAGCTCTAATTAGGAACATTATGTCTCTGACAGGCCCTGATTTCCTCTAGAGGAGGCCCTGTCT
 TTCAAAAGGACGGGGTCAGCCTTGATAGGTTCAAGTCTGCCAGATACAGCGAAGGAGGGTATTCTTCT
 GTCTGCCCGAACCTCTCTCTCATATTTCTGTTAGTACAGACACCATGTCTGATTGACCCAAGACGGG
 AAGAACTACGATTTTATGTTCCAGCCATTGATGCTTTATGCAAGACATGGACATCAGAGCTGGTACAG
 AGAGACACAAGGCTAAGAGACTCTACGTTTCATTGGCACCTCCGATGCAACAGGTGTGTGAGACCCATT
 GACGACGTGACCCTGGAGACCTCTCAGATCTTCGAGTTTCCGGATGTGTGCAAAAAGAATATCCAGAATG
 GTTCTGGGGCTGTGCCTCACTTCCAGAGGCTTCCCGATATCCGTCTGAGACCAGGAGATTTTGAATCT
 CTAAGCGGTAGAGAAAAGTCTCACCATATCGGATCAGCTCAGGGGCTCTTATACTCAATCTTAGTGGCA
 ATTCACGACTCAGGATACAATGATGGAACCATCTTCCCTGTCAACATATACGGCAAGGTTTCCCTAGA
 GACTATTTGAGAGGGGCTCGCAAGGGGAGTATTGATAGGATCCTCGATTGCTTCTTGACAAGAATGACA
 AATATCAATATTAATAGACCTCTGAATTGGTCTCAGGGGTAATCTCATATATTTCTCTGAGGCTAGAT
 AACCATCCCTCCTTGTACATAATGCTCAGAAACCGTCTCTTAGAGGAGAGATTTTTCTATCCCTCAG
 AAAATCCCGCGCTTATCCAAACCACTATGAAAGAGGCAACAGATCAATCTGTGTATCTCCACAT
 GTGCTACGCTATGAGCGAGAGATAATCACGGCTCTCCAGAGAATGACTGGCTATGGATCTTTTCAGAC
 TTTAGAAGTGCCAAAATGACGTACCTATCCCTCACTTACCAGTCTCATCTTCTACTCCAGAGGGTT

GAGAGAAACCTATCTAAGAGTATGAGAGATAACCTGCGACAATTGAGTTCTTTGATGAGGCAGGTGCTG
 GCGGGGCACGGAGAAGATACCTTAGAGTCAGACGACAACATTCAACGACTGCTAAAAGACTCTTTACGA
 AGGACAAGATGGGTGGATCAAGAGGTGCGCCATGCAGCTAGAACCATGACTGGAGATTACAGCCCCAAC
 AAGAAGGTGTCCCGTAAGGTAGGATGTTTCAAGATGGGCTGCTCTGCTCAACAGGTTGCAGTCTCTACC
 TCAGCAAACCCGGCCCCCTGTCTCGGAGCTTGACATAAGGGCCCTCTCTAAGAGGTTCCAGAACCCTTTG
 ATCTCGGGCTTGAGAGTGGTTCAGTGGGCAACCGGTGCTCATTATAAGCTTAAGCCTATTCTAGATGAT
 CTCAATGTTTTCCCATCTCTCTGCTTGTAGTTGGGGACGGGTCAGGGGGGATATCAAGGGCAGTCCTC
 AACATGTTTTCCAGATGCCAAGCTTGTGTTCAACAGTCTTTTAGAGGTGAATGACCTGATGGCTTCCGGA
 ACACATCCACTGCCTCCTTCAGCAATCATGAGGGGAGGAAATGATATCGTCTCCAGAGTGATAGATCTT
 GACTCAATCTGGGAAAAACCGTCCGACTTGAGAAACTTGGCAACCTGGAAATACTTCCAGTCAGTCCAA
 AAGCAGGTCAACATGTCCTATGACCTCATTATTTGCGATGCAGAAGTTACTGACATTGCATCTATCAAC
 CGGATCACCTGTAAATGTCCGATTTTGCATTGTCTATAGATGGACCCTCTATTGGTCTTCAAAACT
 TATGGGACTATGCTAGTAAATCCAACTACAAGGCTATTCAACACCTGTCAAGAGCGTTCCCCTCGGTC
 ACAGGGTTTTATACCCCAAGTAACTTCGTCTTTTTTCATCTGAGCTCTACCTCCGATTCTCCAAACGAGGG
 AAGTTTTTCAGAGATGCTGAGTACTTGACCTCTTCCACCCTTCGAGAAATGAGCCTTGTGTTATTCAAT
 TGTAGCAGCCCCAAGAGTGAGATGCAGAGAGCTCGTTCCTTGAACCTATCAGGATCTTGTGAGAGGATTT
 CCTGAAGAAATCATATCAAATCCTTACAATGAGATGATCATAACTCTGATTGACAGTGATGTAGAATCT
 TTTCTAGTCCACAAGATGGTTGATGATCTTGAGTTACAGAGGGGAACTCTGTCTAAAGTGGCTATCATT
 ATAGCCATCATGATAGTTTTCTCCAACAGAGTCTTCAACGTTTCCAAACCCCTAACTGACCCCTCGTTC
 TATCCACCGTCTGATCCCAAAATCCTGAGGCACCTTCAACATATGTTGCAGTACTATGATGTATCTATCT
 ACTGCTTTAGGTGACGTCCCTAGCTTCGCAAGACTTCACGACCTGTATAACAGACCTATAACTTATTAC
 TTCAGAAAGCAAGTCATTCGAGGGAACGTTTATCTATCTTGGAGTTGGTCCAACGACACCTCAGTGTTT
 AAAAGGGTAGCCTGTAATTCTAGCCTGAGTCTGTCTCTCACTGGATCAGGTTGATTTACAAGATAGTG
 AAGACTACCAGACTCGTTGGCAGCATCAAGGATCTATCCAGAGAAGTGGAAGACACCTTCATAGGTAC
 AACAGGTGGATCACCTAGAGGATATCAGATCTAGATCATCCCTACTAGACTACAGTTGCCTGTGAACC
 GGATACTCCTGGAAGCCTGCCCATGCTAAGACTCTTGTGTGATGTATCTTGAAAAAACAAGATCCTAA
 ATCTGAACCTTTGGTTGTTTGATTGTTTTTCTCAtttttgttgtttatttgtttaagcgt

SEQ ID NO: 45: Secuencia de nucleótidos del vector de vacuna BNSPAG-GP de los Ejemplos

ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAAAAACAGACATTGTCAATTGCAAAGCAAAAATGTAACACCCCTAC
 AATGGATGCCGACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCTGAGATTATCGT
 GGATCAATATGAGTACAAGTACCCTGCCATCAAAGATTGAAAAAGCCCTGTATAACCCTAGGAAAGGC
 TC[^]CGATTTAAATAAAGCATACAAGTCAGTTTTTGTGAGGCATGAGCGCCGCCAAACTTAATCCTGACGA
 TGTATGTTCC[^]TATTTGGCAGCGGCAATGCAGTTTTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGAC[^]CAGCTA
 TGGAATTGTGATTGCACGAAAAGGAGATAAGATCACCCAGGTTCTCTGGTGGAGATAAAACGTACTGA
 TGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAAC[^]TGACAAGAGACCCCACTGTCCCTGAGCATGC
 GTCCTTAGTCGGTCTTCTCTTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCCGGGCAAAACACTGGTAACTA
 TAAGACAAACATTGCAGACAGGATAGAGCAGATTTTTGAGACAGCCCTTTTGTAAAAATCGTGGAACA
 CCATACTCTAATGACAAC[^]TCACAAaATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCAAACTTCAGATTTTTGGC[^]
 CGGAACCTAIGACATGTTTTTCTCCCGGATTGAGCATCTATATTCAGCAATCAGAGTGGGCACAGTTGT
 CACTGCTTATGAAGACTGTT[^]CAGGACTGGTATCATTTACTGGGTT[^]CATAAAACAAATCAATCTCACCGC
 TAGAGAGGCAATACTATATTTCTTCCACAAGAACTTT[^]GAGGAAGAGATAAGAAGAATGTTT[^]GAGCCAGG
 GCAGGAGACAGCTGTTCTC[^]ACTCTTATTT[^]CATCCACTTCCGTT[^]CACTAGGCTT[^]GAGTGGGAAATCTCC
 TTATTCA[^]TCAAATGCTGTTGGTCACGTGTTCAATCTCATTCACTTTGTAGGATGCTATATGGGTCAAGT
 CAGATCCCTAAATGCAACGGTTATTGCTGCATGTGCTCCTCATGAAATGTCTGTTCTAGGGGGCTATCT
 GGGAGAGGAATTCTTCGGGAAAGGGACATTTGAAAGAAGATTCTTCAGAGATGAGAAAGAACTTCAAGA
 ATACGAGGCGGCTGAAC[^]TGACAAAGACTGACGTAGCACTGGCAGATGATGGAAC[^]TGCAACTCTGACGA
 CGAGGACTACTTTTTCAGGTGAAACCAGAAGTCCGGAGGCTGT[^]TTATACTCGAATCATGATGAATGGAGG
 TCGACTAAAGAGATCTCACATACGGAGATATGTCTCAGTCAGTTCCAATCATCAAGCCCGTCCAAACTC
 ATTCGCCGAGTTTCTAAACAAGACATATTCGAGTGACTCATAAcatgaaaaaaactaacacccctcccg
 ta[^]cgcCGCCACCatgGGTGT[^]TACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGA[^]TGATTCAAGAGGACATCATTC
 TTTCTTTGGGTAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCACA
 TTACAGGTTAGTGATGTGACAAACTAGTTTGTCTGACAAACTGTCATCCACAAATCAATTGAGATCA
 GTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTAAAGATGGGGCTTC
 AGGTCCGGTGTCCACCAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAACTGCTACAATCTT
 GAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTCTGGGGCTTCCCCCGG
 TGCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCGGAGACTTTGCCTTCCATAAAGAGGGT
 GCTTTCTTCTGTATGATCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACCAGGAACGACTTTCGCTGAAGGTGTC

GTTGCATTCTGATACTGCCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGGTC
 AATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATTAGATATCAGGCTACCGGTTTTGGA
 ACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTACACA
 CCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAA
 CTAATTTGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAAAaTAAAAAA
 AACCTCACTAGAAAAaTTGCGAGTGAAGAGTTgTCTTTCACAGTTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATC
 AGTGGTCAGAGTCCGGCGCGAACTTCTTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACCTGAAGACCACAAAATC
 ATGGCTTCAGAAAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTGCGAT
 CTGACAACCCCTGCCACAATCTCCACGAGTCTTCAACCCCCACAACCAACCAGGTCCGGACAACAGC
 ACCCACAAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACAACATCACCGCAGA
 ACAGACAACGACAGCACAGCcTCCGACACTCCcTCTGCCACGACcGCAGCCGACCCCCAAAAGCAGAG
 AACACCAACAGGAGCAAGAGCACTGACITCCTGGACCCCGCCACCACAACAAGTCCCCAAAACCACAGC
 GAGACCCCTGGCAACAACAACACTCATACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGCAGCGGGGAAGCTA
 GGCCTTAATTACCAATACTATTGCTGGAGTGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGAAGAACTCGAAGAGAA
 GCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCT
 GCAATCGGCTGGCTGGATACCATATTTCCGGCCAGCCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTAATG
 CACAATCAAGATGGTTTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTG
 TTCTTGAGAGCCACAACCTGAGCTACGCACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCTG
 CAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTCIGGGACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAG
 AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTGATAAAACCCCTTCCGGACCCAGGGGGAC
 AATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTGTAATT
 CGCATTATCGCTTTATTTCTGTATATGCAAAATTTGTCTTTTAGGAGCTAGCCATGAAAAAACTAACACC
 CCTCCTTTCCGAACCATCCCAACATGAGCAAGATCTTTGTCAATCCTAGTGCTATTAGAGCCGGTCTGG
 CCGATCTTGAGATGGCTGAAGAACTGTTGATCTGATCAATAGAAAATATCGAAGACAATCAGGCTCATC
 TCCAAGGGGAACCCATAGAGGTGGACAATCTCCCTGAGGATATGGGGCGACTTCACCTGGATGATGGAA
 AATCGCCCAACCATGGTGAGATAGCCAAGGTGGGAGAAGGCAAGTATCGAGAGGACTTTCAGATGGATG
 AAGGAGAGGATCCTAGCTTCTGTTCAGTCATACCTGGAAAATGTTGGAGTCCAAATAGTCAGACAAA
 TGAGGTCAAGGAGAGAGATTTCTCAAGATATGGTCACAGACCCGTAGAAGAGATTATCCTATGTCGCGG
 TCAACTTTCCCAACCCCTCCAGGAAAGTCTTCAGAGGATAAATCAACCCAGACTACTGGCCGAGAGCTCA
 AGAAGGAGACAACACCCACTCCTTCTCAGAGAGAAAGCCAATCATCGAAAGCCAGGATGGCGGCTCAAA
 TTGCTTCTGGCCCTCCAGCCCTTGAATGGTCCGGCTACCAATGAAGAGGATGATCTATCAGTGGAGGCTG
 AGATCGCTCAACAGATTGCAGAAAGTTTCTCCAAAAATATAAGTTTCCCTCTCGATCCTCAGGGATAC
 TCTTGATAATTTTGAGCAATTGAAAATGAACCTTGATGATATAGTTAAAGAGGCAAAAAATGTACCAG
 GTGTGACCCGTTTAGCCCATGACGGGTCCAAACTCCCCCTAAGATGTGTACTGGGATGGGTGCGCTTTGG
 CCAACTCTAAGAAATTCCAGTTGTTAGTCAATCCGACAAGCTGAGTAAAATCATGCAAGATGACTTGA
 ATCGCTATACATCTTGCTAACCGAACCTCTCCCTCAGTCCCTCTAGACAATAAAATCCGAGATGTCCC
 AAAGTCAACATGAAAAAAACAGGCAACACCACTGATAAAATGAACCTCCTACGTAAGATAGTGAAAAAC
 CGAAGGGACGAGGACACTCAAAAAATCCTCTCCGCGCTCAGCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTT
 CCACCCCTGAATACGTCCCGCTGAAAGAATTACAGGCAAGAAGAACATGAGGAACCTTTGTATCAAC
 GGAAGGGTTAAAGTGTGTAGCCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCCTGCGGCACATTCTGAAATCATT
 GACGAGATATATTCTGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAGTGGTTATTGGACTGGCTTTGTCA
 GGATCTCCAGTCCCTGAGGGCTGAACCTGGGTATACAAATTGAGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGGCT
 GATTCCAGGGGGCCCTCTTGAAGGGGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACT
 GAGTTCGTCCGATTGCAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTATATCCAGGGCAGAGTCTGGTGTATC
 AACATGAACCCGAGAGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCTTCAACACAAAGGTCCGGAAGAGGAC
 AAAGATTCTCTCTGCTTCTAGAATAATCAGATTATATCCCGCAAATTTATCACTTGTTTACCTCTGGA
 GGAGAGAACATATGGGCTCAACTCCAACCTTGGGAGCAATATAACAAAAAACATGTTATGGTGCCATT
 AAACCGCTGCATTTTCATCAAAGTCAAGTTGATTACCTTTACATTTTGTATCCTCTTGGATGTGAAAAAA
 CTATTAAATCCCTCAAAAGACccctaaCGTCCTTTCACGATCCAAGTCCatgaaaadaactaacacc
 cctcccgtagcttagctTATAAAGTGCTGGGTCACTTAAGCTTTTCAGTCGAGAAAAAAACATTAGATCA
 GAAGAACAACCTGGCAACACTTCTCAACCTGAGACTTACTTCAAGATGCTCGATCCTGGAGAGGTCTATG
 ATGACCCCTATTGACCCAATCGAGTTAGAGGTGAACCCAGAGGAACCCCATTTGTCCCCAACATCTTGA
 GGAACTCTGACTACAAATCTCAACTCTCCTTTGATAGAAGATCCTGCTAGACTAATGTTAGAATGGTTAA
 AAACAGGGAATAGACCTTATCGGATGACTCTAACAGACAATTGCTCCAGGTCTTTCAGAGTTTGAAG
 ATTAATTTCAAGAAGGTAGATTGGGTTCTCTCAAGGTGGGCGGAATGGCTGCACAGTCAATGATTTCTC
 TCTGGTTATATGGTGGCCACTCTGAATCCAACAGGAGCCGAGATGTATAACAGACTTGGCCCATTTCT
 ATTCCAAGTCGTCCCCCATAGAGAAAGCTGTTGAATCTCACGCTAGGAAATAGAGGGCTGAGAATCCCC
 CAGAGGGAGTGTTAAGTTGCCTTGAGAGGGTTGATTATGATAATGCATTTGGAAGGTATCTTGCCAACA
 CGTATTCCTCTTACTTGTCTTCCATGTAATCACCTTATACATGAACGCCCTAGACTGGGATGAAGAAA
 AGACCATCCTTATGGAAGATTTTAACTCAGTGGACATCGGGAAGGACTTGGTAAAAGTTCAAAG
 ACCAAATATGGGGACTGCTGATCGTGACAAAGGACTTTGTTTACTCCCAAAGTTCCAATTGTCTTTTTG

ACAGAACTACACACTTATGCTAAAAGATCTTTTCTTGCTCGCTTCAACTCCTTAATGGTCTTGCTCT
 CTCCCCCAGAGCCCCGATACTCAGATGACTTGATACTCAACTATGCCAGCTGTACATTGCTGGGGATC
 AAGTCTTGCTATGTGTGGAACTCCGGCTATGAAGTCATCAAAATATTGGAGCCATATGTCGTGAATA
 GTTAGTCCAGAGAGCAGAAAAGTTTAGGCCTCTCATTTCCTTGGGAGACTTTCCCTGTATTATATA
 AAGACAAGGTAAGTCAACTTGAAGAGACGTTCCGGTCCCTGTGCAAGAAGGTTCTTTAGGGCTCTGGATC
 AATTGACAACATACATGACTTGGTTTTTGTGTTTGGCTGTTACAGGCATTGGGGGCACCCATATATAG
 ATTATCGAAAGGGTCTGTCAAACTATATGATCAGGTTACCTTAAAAAATGATAGATAAGTCCTACC
 AGGAGTGCTTAGCAAGCGACCTAGCCAGGAGGATCCTTAGATGGGGTTTTGATAAGTACTCCAAGTGGT
 ATCTGGATTCAAGATTCTAGCCCCGAGACCACCCCTTGACTCCTTATATCAAAACCCAAACATGGCCAC
 CCAAACATATTGTAGACTTGGTGGGGGATACATGGCACAAGCTCCCGATCAGCGAGATCTTTGAGATT
 CTGAATCAGATGGTATTTCTGTCTAGATCAAGATGTTGGATTGAAGAGAGTGTTCCTACACGAGACGAGATCTT
 CTGGCTGTGCAAAAACCGAGGGGGGCTGTTCTAGCGAAAAAGTTATTATCACGGCCCTGTCTAAGC
 CGCTGTCAATCCCCGAGAGTTTTCTGAGGTCTATAGACCTCGGAGGATTGCCAGATGAAGACTTGATAA
 TTGGCCTCAAGCCAAAGGAACGGGAATTGAAGATTGAAGGTCGATTCTTTGCTCTAATGTCATGGAATC
 TAAGATTGTATTTTGTCTCATCTGAAAACTCTTGGCCAACATCTTGGCCTTTTGACGCGCTGA
 CTATGACAGACAACCTGAACAAGGTGTTAAAAAGCTGATCGACAGGGTCACCGGGCAAGGGCTTTTGG
 ACTATTCAAGGGTCACATATGCAATTTACCTGGACTATGAAAAGTGAACAACCATCAAGATTAGAGT
 CAACAGAGGATGTTATTTCTGTCTAGATCAAGATGTTGGATTGAAGAGAGTGTTCCTAGAACACAG
 AGTTTTTTTCAAAAGGCTGGATCTATTATTAGACAGATCAGACCTCATCGGGTTACGGGAGGATCAAA
 TATACTGCTTAGATGCGTCCAACGGCCCAACCTGTTGGAATGGCCAGGATGGCGGGCTAGAAGGCTTAC
 GGCAGAAGGGCTGGAGTCTAGTCAGCTTATTGATGATAGATAGAGAATCTCAAATCAGGAACACAAGAA
 CCAAAATACTAGCTCAAGGAGACAACCAGGTTTTATGTCCGACATACATGTTGTCCGCCAGGGCTATCTC
 AAGAGGGGCTCCTCTATGAATTGGAGAGAATATCAAGGAATGCACCTTCGATATACAGAGCCGTCGAGG
 AAGGGGCATCTAAGCTAGGGCTGATCATCAAGAAAGAAGAGACCATGTGTAGTTATGACTTCCTCATCT
 ATGGAAAAACCCCTTTGTTTAGAGGTAACATATTGGTGCCTGAGTCCAAAAGATGGGCCAGAGTCTCTT
 GCGTCTCTAATGACCAAAATAGTCAACCTCGCCAATATAATGTGACAGTGTCCACCAATGCGCTAACAG
 TGGCACAACACTCTCAATCTTTGATCAAACCGATGAGGGATTTCTGCTCATGTGACTACAGGCAGTCT
 TTCACTACCTGCTATTTAGCCCAATCTTAAAGGGAAGAGTTTACAAGATTCTGAGCGCTGAAGGGGAGA
 GCTTTCTCCTAGCCATGTCAAGGATAATCTATCTAGATCCTTCTTTGGGAGGGATATCTGGAATGTCCC
 TCGGAAGATTCCATATACGACAGTTCTCAGACCTGTCTCTGAAGGGTTATCCTTCTGGAGAGAGATCT
 GGTTAGCCTTCCAAAGAGTCTGGATTACGCGCTGTGTCAGAGGCTGGAACCCAGATCTGGAGAGA
 GAACACTCGAGAGCTTCACTCGCCTTCTAGAAGATCCGACCACCTTAAATATCAGAGGAGGGGCCAGTC
 CTACCATTCTACTCAAGGATGCAATCAGAAAGGCTTTATATGACGAGGTGGACAAGGTGGAAAATTCAG
 AGTTTCGAGAGGCAATCCTGTTGTCCAAGACCCATAGAGATAATTTTATACTCTTCTAATATCTGTIG
 AGCCTCTGTTTCTCGATTCTCTCAGTGAGCTATTCTAGTTCGCTTTTTTGGGAATCCCGAGTCAATCA
 TTGGATTGATACAAAACCTCCGCAACGATAAGAAGGCAGTTTAGAAAGAGTCTCTCAAAAACCTTTAGAAG
 AATCCTTCTACAACTCAGAGATCCACGGGATTAGTTCGGATGACCCAGACACCTCAGAGGGTTGGGGGGG
 TGTGACCTTGTCTTTCAGAGAGGGCAGATCTACTTAGGGAGATCTCTTGGGGAAGAAAAGTGGTAGGCA
 CGACAGTTCCTCACCCCTTCTGAGATGTTGGGATTACTTCCCAAGTCCTCTATTTCTTGCACTTGTGGAG
 CAACAGGAGGAGGCAATCCTAGAGTTCTGTATCAGTACTCCCGTCTTTGATCAGTCATTTTTTTCAC
 GAGGCCCTTAAAGGATACCTTGGGCTCGTCCACCTCTATGTCGACCCAGCTATTCCATGCAATGGGAAA
 AAGTCACTAATGTTCATGTGGTGAAGAGAGCTCTATCGTTAAAAGAATCTATAAACTGGTTTACTACTA
 GAGATTCCAACCTTGGCTCAAGCTCTAATTAGGAACATTATGTCTCTGACAGGCCCTGATTTCCCTCTAG
 AGGAGGCCCTGTCTTCAAAAGGACGGGGTCAGCCTTGATAGGTTCAAGTCTGCCAGATACAGCGAAG
 GAGGGTATTCTTCTGTCTGCCGAACTCCTCTCTCATATTTCTGTTAGTACAGACACCATGTCTGATT
 TGACCCAAGACGGGAAGAATACTACGATTTCTGTTCCAGCCATTGATGCTTTATGCACAGACATGGACAT
 CAGAGCTGGTACAGAGAGACACAAGGCTAAGAGACTCTACGTTTCAATTGGCACCTCCGATGCAACAGGT
 GTGTGAGACCCATTGACGACGTGACCCTGGAGACCTCTCAGATCTTCGAGTTTCCGGATGTGTGCAAAA
 GAATATCCAGAATGGTTTTCTGGGGCTGTGCCTCACTTCCAGAGGCTTCCCGATATCCGCTGTGAGACCAG
 GAGATTTTGAATCTCTAAGCGGTAGAGAAAAGTCTCACCATACTCGGATCAGGTCAGGGGCTCTTATACT
 CAATCTTAGTGGGTAATTCAGACTCAGGATACAAATGATGGAACCATCTTCCCTGTCAACATATACGGCA
 AGGTTTTCCCTAGAGACTATTTGAGAGGGCTCGCAAGGGGAGTATTGATAGGATCCTCGATTGTCTTCT
 TGACAAGAATGACAAATATCAATATTAATAGACCTCTTGAATTGGTCTCAGGGGTAATCTCATATATTCT
 TCCTGAGGCTAGATAACCATCCCTCCTTGTACATAATGCTCAGAGAACCCTCTCTTAGAGGAGAGATAT
 TTTCTATCCCTCAGAAAATCCCGCCGCTTATCCAACCACTATGAAAGAAGGCAACAGATCAATCTTGT
 GTTATCTCCAACATGTGCTACGCTATGAGCGAGAGATAATCACGGCGTCTCCAGAGAATGACTGGCTAT
 GGATCTTTTTCAGACTTTAGAAGTGCCAAAATGACGTACCTATCCCTCATTACTTACCAGTCTCATCTTCT
 TACTCCAGAGGGTTGAGAGAAAACCTATCTAAGAGATGAGAGATAACCTGCGACAAATTGAGTTCTTTGA
 TGAGGCAGGTGCTGGGCGGGCACGGAGAAGATACCTTAGAGTCAGACGACAACATTCAACGACTGCTAA
 AAGACTCTTTACGAAGGACAAGATGGGTGGATCAAGAGGTGCGCCATGCAGCTAGAACCATGACTGGAG
 ATTACAGCCCCAACAGAAGGTGTCCCGTAAGGTAGGATGTTCAGAAATGGGTCTGCTCTGCTCAACAGG

TTGCAGTCTCTACCTCAGCAAACCCGGCCCCCTGTCTCGGAGCTTGACATAAGGGCCCTCTCTAAGAGGT
 TCCAGAACCCTTTTGATCTCGGGCTTGAGAGTGGTTCAGTGGGCAACCGGTGCTCATTATAAGCTTAAGC
 CTATTCTAGATGATCTCAATGTTTTCCCATCTCTCTGCCTTGTAGTTGGGGACGGGTCAGGGGGGATAT
 CAAGGGCAGTCCTCAACATGTTTTCCAGATGCCAAGCTTGTGTTCAACAGTCTTTTAGAGGTGAATGACC
 TGATGGCTTCCGGAACACATCCACTGCCTCCTTCAGCAATCATGAGGGGAGGAAATGATATCGTCTCCA
 GAGTGATAGATCTTGACTCAATCTGGGAAAAACCGTCCGACTTGAGAACTTGGCAACCTGGAAATACT
 TCCAGTCAGTCCAAAAGCAGGTCAACATGTCCTATGACCTCATTATTTGCGATGCAGAAGTTACTGACA
 TTGCAICTATCAACCGGATCACCCTGTAAATGTCCGATTTTGCATTGTCTATAGATGGACCACTCTATT
 TGGTCTTCAAACTTATGGGACTATGCTAGTAAATCCAACTACAAGGCTATTCAACACCTGTCAAGAG
 CGTTCCCCTCGGTACAGGGTTTATCACCCAAGTAACTTCGTCTTTTTCATCTGAGCTCTACCTCCGAT
 TCTCCAAACGAGGGAAAGTTTTTCAGAGATGCTGAGTACTTGACCTCTTCCACCCTTCGAGAAATGAGCC
 TTGTGTTATTCAATTGTAGCAGCCCCAAGAGTGAGATGCAGAGAGCTCGTTCCCTTGAACATCAGGATC
 TTGTGAGAGGATTTCCCTGAAGAAATCATAATCAAATCCTTACAATGAGATGATCATAACTCTGATTGACA
 GTGATGTAGAATCTTTTCTAGTCCACAAGATGGTTGATGATCTTGAGTTACAGAGGGGAACCTCTGTCTA
 AAGTGGCTATCATTATAGCCATCATGATAGTTTTCTCCAACAGAGTCTTCAACGTTTCCAAACCCCTAA
 CTGACCCCTCGTTCTATCCACCGTCTGATCCCAAATCCTGAGGCACCTCAACATATGTTGCAGTACTA
 TGATGTATCTATCTACTGCTTTAGGTGACGTCCCTAGCTTCGCAAGACTTCACGACCTGTATAACAGAC
 CTATAACTTATTACTTCAGAAAGCAAGTCATTCGAGGGAAACGTTTATCTATCTTGGAGTTGGTCCAACG
 ACACCTCAGTGTTCAAAAGGGTAGCCTGTAATTCAGCCTGAGTCTGTCTATCTCACTGGATCAGGTTGA
 TTTACAAGATAGTGAAGACTACCAGACTCGTTGGCAGCATCAAGGATCTATCCAGAGAAGTGGAAAGAC
 ACCTTCATAGGTACAACAGGTGGATCACCTTAGAGGATATCAGATCTAGATCATCCCTACTAGACTACA
 GTTGCTGTGAACCGGATACTCCTGGAAGCCTGCCCATGCTAAGACTCTTGTGTGATGTATCTTGAAAA
 AAACAAGATCCTAAATCTGAACCTTTGGTTGTTTGATTGTTTTTCTCAtttttgttgtttattttgttaa
 gcgt

SEQ ID NO: 46: Secuencia de nucleótidos del vector de vacuna BNSPAG-GP_{GCD} de los Ejemplos

ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAAAAACAGACATTGTCAATTGCAAAGCAAAAATGTAACACCCCTAC
 AATGGATGCCGACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCTGAGATTATCGT
 GGATCAATATGAGTACAAGTACCCTGCCATCAAAGATTTGAAAAAGCCCTGTATAACCCTAGGAAAGGC
 TCCCGATTTAAATAAAGCATACAAGTCAGTTTTTGTGAGGCATGAGCGCCGCCAAACTTAATCCTGACGA
 TGTATGTTCCCTATTTGGCAGCGCAATGCAGTTTTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGACCAGCTA
 TGGAAATTGTGATTGCACGAAAAGGAGATAAGATCACCCAGGTTCCTCTGGTGGAGATAAAACGTACTGA
 TGTAAGAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAAGTACAAGAGACCCCACTGTCCCTGAGCATGC
 GTCCTTAGTCGGTCTTCTCTTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCCGGGCAAAACACTGGTAACCTA
 TAAGACAAACATTGCAGACAGGATAGAGCAGATTTTGTAGACAGCCCTTTTGTAAATCGTGGAACA
 CCATACTCTAATGACAACCTCACAAATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCAAACCTTCAGATTTTGGC
 CGGAACCTATGACATGTTTTTCTCCCGGATTGAGCATCTATATTAGCAATCAGAGTGGGCACAGTTGT
 CACTGCTTATGAAGACTGTTTCAGGACTGGTATCATTACTGGGTTTATAAAACAAATCAATCTCACCGC
 TAGAGAGGCAATACTATATTTCTCCACAAGAAGTTTGGAGGAAGAGATAAGAAGAATGTTTGAGCCAGG
 GCAGGAGACAGCTGTTCCCTCACTCTTATTTTCACTCCACTTCCGTTCACTAGGCTTGAGTGGGAAATCTCC
 TTATTCATCAAATGCTGTTGGTTCAGTGTTCATCTCATTCACTTTGTAGGATGCTATATGGGTCAAGT
 CAGATCCCTAAATGCAACGGTTATTGCTGCATGTGCTCCTCATGAAATGTCTGTTCTAGGGGGCTATCT
 GGGAGAGGAATTTCTTCGGGAAAGGGACATTTGAAAGAAGATTCCTCAGAGATGAGAAAGAAGTTCAAGA
 ATACGAGGCGGCTGAACTGACAAAGACTGACGTAGCACTGGCAGATGATGGAAGTGTCAACTCTGACGA
 CGAGGACTACTTTTCAGGTGAAACCAGAAGTCCGGAGGCTGTTTATACTCGAATCATGATGAATGGAGG
 TCGACTAAAGAGATCTCACATACGGAGATATGTCTCAGTCAGTTCCAATCATCAAGCCCGTCCAAACTC
 ATTCGCCGAGTTTCTAAACAAGACATATTCGAGTGACTCATAAacàtgaàaaaaàactaacacccctcccG
 TACGCCGCCACCATgGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAGGACATCATTC
 TTTCTTTGGGTAAATATCCTTTTCCAAAGAAGATTTTCCATCCCCTTGAGGTCATCCACAATAGCACA
 TTACAGGTTAGTGATGTCGACAAACTAGTTTGTGCTGACAAACTGTCATCCACAAATCAATTGAGATCA
 GTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTC
 AGGTCCGGTGTCCACCAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAAGTGTACAAATCTT
 GAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTGGGGCTTCCCCCGG
 TGCCGGTATGTGACAAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCATAAAGAGGGT
 GCTTTCTTCCCTGTATGATCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTTCGCTGAAGGTGT
 GTTGCAATTTCTGATACCTGCCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGGTC
 AATGCAACGGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATTAGATATCAGGCTACCGGTTTGGGA

ACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTTCACA
 CCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAA
 CTAATTITGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCTTCTGGGAAacTAAAAAA
 AACCTCACTAGAAAAaTTCGCAGTGAAGAGTTgTCTTTACAGTTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATC
 AGTGGTCAGAGTCCGGCGCGAACTTCTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACCTGAAGACCACAAAATC
 ATGGCTTCAGAAAAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTGCGAT
 CTGACAACCCCTGCCACAATCTCCACGAGTCTTCAACCCCCCAACAACCAACCAGGTCCGGACAACAGC
 ACCCAACAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACAACATCACCGCAGA
 ACAGACAACGACAGCACAGCcTCCGACACTCCcTCTGCCACGACcGCAGCCGGACCCCAAAAGCAGAG
 AACACCAACACGAGCAAGAGCACTGACTTCCTGGACCCCGCCACCACAACAAGTCCCAAAAACACAGC
 GAGACCGCTGGCAACAACAACACTCATCACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGCAGCGGGAAGCTA
 GGCTTAATTACCAATACTATTGCTGGAGTTCGAGGACTGATCAGGCGGGAGAAGAACTCGAAGAGAA
 GCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTTACATTACTGGACTIONTCAAGGTGCT
 GCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATTTCCGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTAATG
 CACAATCAAGATGGTTTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTG
 TTCTTGAGAGCCACAACCTGAGCTACGCACCTTTTCAATCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCTG
 CAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTCTGGGACCGGACTGCTGTATCGAACACATGATTGGACCAAG
 AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTGTGATAAAACCTTCCGGACCAGGGGGAC
 AATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTGTAATT
 GCAGTTATCGCTTTATTCTGTATATGCGttaaCAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTACGCAACACAAT
 CTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCAGTCACTCCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCA
 CACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTAAGCTAGCCATGAAAAAACTAACACCCCTCCTTTTCGAACC
 ATCCCAACATGAGCAAGATCTTTGTCAATCCTAGTGCTATTAGAGCCGGTCTGGCCGATCTTGAGATG
 GCTGAAGAACTGTTGATCTGTATCAATAGAAATATCGAAGACAATCAGGCTCATCTCCAAGGGGAACCC
 ATAGAGGTGGACAATCTCCCTGAGGATATGGGGCGACTTCACCTGGATGATGGAAAAATCGCCCAACCAT
 GGTGAGATAGCCAAGGTGGGAGAAGGCAAGTATCGAGAGGACTTTCAGATGGATGAAGGAGAGGATCCT
 AGCTTCCTGTTCAGTCTATACCTGGAAAAATGTTGGAGTCCAAATAGTCAGACAAATGAGGTGAGGAGAG
 AGATTCTCAAGATATGGTTCACAGACCGTAGAAGAGATTATATCCTATGTGCGGGTCAACTTTCCCAAC
 CCTCCAGGAAAGTCTTCAGAGGATAAATCAACCCAGACTACTGGCCGAGAGCTCAAGAAGGAGACAACA
 CCCACTCCTTCTCAGAGAGAAAGCCAATCATCGAAAGCCAGGATGGCGGCTCAAAATTGCTTCTGGCCCT
 CCAGCCCTTGAATGGTCGGCTACCAATGAAGAGGATGATCTATCAGTGGAGGCTGAGATCGCTCACCAG
 ATTGCAGAAAGTTTCTCCAAAAATATAAGTTTCCCTCTCGATCCTCAGGGATACTTTGTATAATTTT
 GAGCAATTGAAAATGAACCTTGATGATATAGTTAAAGAGGCAAAAAATGTACCAGGTGTGACCCGTTTA
 TGAGGGCTGAACCTGGGTATACAATTGAGGAGAAGCTTTTATCTTCCAGTGGGCTGATTCCAGGGGCC
 TCTTGAGGGGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCTGTCGGATT
 GCAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTATATCCAGGGCAGAGTCTGGTGTATCAACATGAACCCGAG
 AGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCTCAGACACAAAGGTCCGAAGAGGACAAAGATTCTCTCT
 GCTTCTAGAATAATCAGATTATATCCCGCAAAATTTATCACTTGTTTTACCTCTGGAGGAGAGAACATATG
 GGCTCAACTCCAACCCCTGGGAGCAATATAACAAAAACATGTTATGGTGCCATTAAACCGCTGCATT
 CATCAAAGTCAAGTTGATTACCTTTACATTTTGATCCTCTTGGATGTGAAAAAACTATTAACTCCCT
 CAAAAGACccctaaCGTCCCTTTCAACGATCCAAGTCAatgaaaaaaactaacaccocctcccgtaacctag
 eTTATAAAGTGCTGGGTATCTAAGCTTTTCAGTCGAGAAAAAACATTAGATCAGAAGAACAACCTGGC
 AACACTTCTCAACCTGAGACTTACTTCAAGATGCTCGATCCTGGAGAGGTCTATGATGACCCCTATTGAC
 CCAATCGAGTTAGAGGCTGAACCCAGAGGAACCCCATTTGTCCTCAACATCTTGAGGAACCTCTGACTAC
 AATCTCAACTCTCCTTTGATAGAAGATCCTGCTAGACTAATGTTAGAATGGTTAAAAACAGGGAATAGA
 CCTATCGGATGACTCTAACAGACAATGCTCCAGGTCTTTCAGAGTTTTGAAAGATTATTTCAAGAAG
 GTAGATTTGGGTTCTCTCAAGGTGGGCGGAATGGCTGCACAGTCAATGATTCTCTCTGGTTATATGGT
 GCCCACTCTGAATCCAACAGGAGCCGGAGATGTATAACAGACTTGGCCCATTTCTATTCCAAGTCGTC
 CCCATGAGAGAAGCTGTTGAATCTACGCTAGGAAATAGAGGGCTGAGAATCCCCCAGAGGGAGTGTTA
 AGTTCCTTTGAGAGGGTTGATTATGATAATGCATTTTGAAGGIATCTTGCCAACACGTATTCTCTTAC
 TTGTTCTTCCATGTAATCACCTTATACATGAACGCCCTAGACTGGGATGAAGAAAAGACCATCTAGCA
 TTATGGAAAAGATTTAACCTCAGTGGACATCGGGAAGGACTTGGTAAAGTTCAAAGACCAATATGGGGA
 CTGCTGATCGTGACAAAGGACTTTGTTTACTCCCAAAGTTCCAATTGCTTTTTGACAGAACTACACA

CTTATGCTAAAAGATCTTTTCTTGCTCGCTTCAACTCCTTAATGGTCTTGCTCTCTCCCCAGAGCCC
 CGATACTCAGATGACTTGATATCTCAACTATGCCAGCTGTACATTGCTGGGGATCAAGTCTTGCTATG
 TGTGGAACTCCGGCTATGAAGTCATCAAAATATTGGAGCCATATGTCGTGAATAGTTTAGTCCAGAGA
 GCAGAAAAGTTTAGGCCTCTCATTCACTTCTTGGGAGACTTTCTGTATTTATAAAAGACAAGGTAAGT
 CAACTTGAAGAGACGTTCCGTCCCTGTGCAAGAAGGTTCTTTAGGGCTCTGGATCAATTCGACAACATA
 CATGACTTGGTTTTTGTGTTTGGCTGTTACAGGCATTGGGGGCACCCATATATAGATTATCGAAAGGGT
 CTGTCAAACTATATGATCAGGTTACCTTAAAAAATGATAGATAAGTCCCTACCAGGAGTGCTTAGCA
 AGCGACCTAGCCAGGAGGATCCTTAGATGGGGTTTTGATAAGTACTCCAAGTGGTATCTGGATTCAAGA
 TTCTTAGCCCGAGACCACCCCTTGACTCCTTATATCAAAACCCAAACATGGCCACCCAAACATATTGTA
 GACTTGGTGGGGGATACATGSCACAAGCTCCCGATCAGCAGATCTTTGAGATTCTTGAATCAATGGAT
 CCGTCAGAAATATTGGATGACAAATCACATTCTTTACCAGAACGAGACTAGCTTCTTGGCTGTGAGAA
 AACCGAGGGGGCTGTCTTAGCGAAAAAGTTATTATCACGGCCCTGICTAAGCCGCTGTCAATCCC
 CGAGAGTTTCTGAGGTCTATAGACCTCGGAGGATTGCCAGATGAAGACTTGATAATTGGCCTCAAGCCA
 AAGGAACGGGAATTGAAGATTGAAGGTCGATTCTTTGCTCTAATGTCATGGAATCTAAGATTGATTTT
 GTCATCACTGAAAACTCTTGCCAACTACATCTTGCCACTTTTTGACGCGCTGACTATGACAGACAAC
 CTGAACAAGGTGTTTTAAAAAGCTGATCGACAGGGTCACCGGGCAAGGGCTTTTGGACTATTCAAGGGTC
 ACATATGCATTTACCTGGACTATGAAAAGTGGAAACAACCATCAAAGATTAGAGTCAACAGAGGATGTA
 TTTTCTGTCTAGATCAAGTGTGTTGGATTGAAGAGAGTGTCTTAGAACACACGAGTTTCTTCAAAG
 GCTCGGATCTATTATTAGACAGATCAGACCTCATCGGGTTACGGGAGGATCAAAATATCTGCTTAGAT
 GCGTCCAACGGCCCAACCTGTGGAATGGCCAGGATGGCGGGCTAGAAGGCTTACGGCAGAAGGGCTGG
 AGTCTAGTCAGCTTATTGATGATAGATAGAGAATCTCAAATCAGGAACACAAGAACCAAAATACTAGCT
 CAAGGAGACAACCAGGTTTTATGTCCGACATACATGTTGTGCGCCAGGGCTATCTCAAGAGGGGCTCCTC
 TATGAATTGGAGAGAATATCAAGGAATGCATTTTCGATATACAGAGCCGTCGAGGAAGGGGCATCTAAG
 CTAGGGCTGATCATCAAGAAAGAGAGACCATGTGTAGTTATGACTTCTCATCTATGGAAAAACCCCT
 TTGTTTAGAGGTAACATATTGGTGCTGAGTCCAAAAGATGGGCCAGAGTCTCTTGCGTCTCTAATGAC
 CAAATAGTCAACCTCGCCAAATATAATGTGACAGTGTCCACCAATGCGCTAACAGTGGCACAACACTCT
 CAATCTTTGATCAAAACCGATGAGGGATTTCTGCTCATGTGTCAGTACAGGCAGTCTTCACTACCTGCTA
 TTTAGCCCAATCTTAAAGGGAGAGTTTACAAGATTCTGAGCGCTGAAGGGGAGAGCTTTCTCCTAGCC
 ATGTCAAGGATAATCTATCTAGATCCTTCTTTGGGAGGGATATCTGGAATGTCCCTCGGAAGATTCCAT
 ATACGACAGTTCTCAGACCTGTCTCTGAAGGGTTATCCTTCTGGAGAGAGATCTGGTTAAGCTCCCAA
 GAGTCTTGGATTACGCGTGTGTCAAGAGGCTGGAAACCCAGATCTTGGAGAGAGAACACTCGAGAGC
 TCACTCGCCTTCTAGAAGATCCGACCACCTTAAATATCAGAGGAGGGGCCAGTCTTACCATTCTACTC
 AAGGATGCAATCAGAAAGGCTTTATATGACGAGGTGGACAAGGTGGAAAATTAGAGTTTGGAGAGGCA
 ATCCTGTTGTCCAAGACCCATAGAGATAATTTTATCTCTTCTTAAATATCTGTTGAGCCTCTGTTTCTC
 CGATTTCTAGTGAGCTATTGAGTTCGTCTTTTGGGAATCCCGAGTCAATCATCTGAGATTGATACAA
 AACTCCCGAAGCATAAGAAGGCAGTTTAGAAAGAGTCTCTCAAAAACCTTTAGAAGAATCTTCTACAAC
 TCAGAGATCCACGGGATTAGTCGGATGACCCAGACACCTCAGAGGGTTGGGGGGGTGTGGCCTTGCTCT
 TCAGAGAGGGCAGATCTACTTAGGGAGATCTCTTGGGGAAGAAAAGTGGTAGGCACGACAGTTCTCTAC
 CCTCTGAGATGTTGGGATTACTTCCCAAGTCTCTATTTCTTGCACTTGTGGAGCAACAGGAGGAGGC
 AATCCTAGAGTTTCTGTATCAGTACTCCCGTCTTTGATCAGTCAATTTTTTACAGAGGCCCCCTAAAG
 GGATACTTGGGCTCGTCCACCTCTATGTGACCCAGCTATTCCATGCAATGGGAAAAGTCACTAATGTT
 CATGTGGTGAAGAGCTCTATCGTTAAAGAATCTATAAACTGGTTCATTACTAGAGATTCCAATTG
 GCTCAAGCTCTAATTAGGAACATTATGTCTCTGACAGGCCCTGATTTCCCTCTAGAGGAGGCCCTGTCT
 TTCAAAAGGACGGGTCAGCCTTGATAGGTTCAAGTCTGCCAGATACAGCGAAGGAGGGTATTCTTCT
 GTCTGCCGAACCTCCTCTCTCATATTTCTGTTAGTACAGACACCATGTCTGATTGACCCAAGACGGG
 AAGAATACGATTTTATGTTCCAGCCATTGATGCTTTATGCACAGACATGGACATCAGAGCTGGTACAG
 AGAGACACAAGGCTAAGAGACTCTACGTTTCAATGGCACCTCCGATGCAACAGGTGTGTGAGACCCATT
 GACGACGTGACCCTGGAGACCTCTCAGATCTTCGAGTTTCCGGATGTGTGCGAAAAGAATATCCAGAATG
 GTTCTGCGGCTGTGCTCACTTCCAGAGGCTTCCCGATATCCGCTGAGACCAGGAGATTTTGAATCT
 CTAAGCGGTAGAGAAAAGTCTCACCATATCGGATCAGCTCAGGGGCTCTTATACTCAATCTTAGTGGCA
 ATTACGACTCAGGATACAAATGATGGAACCATCTCCCTGTCAACATATACGGCAAGGTTTCCCTTAGA
 GACTATTTGAGAGGGCTCGCAAGGGGAGTATTGATAGGATCCTCGATTGTCTTCTTGACAAGAATGACA
 AATATCAATATTAATAGACCTCTTGAATTGGTCTCAGGGGTAATCTCATATATTTCTCTGAGGCTAGAT
 AACCATCCCCTCTTGTACATAATGCTCAGAGAACCGTCTCTTAGAGGAGAGATATTTCTATCCCTCAG
 AAAATCCCCGCCGCTTATCCAACCACTATGAAAGAAGGCAACAGATCAATCTTGTGTTATCTCCAACAT
 GTGCTACGCTATGAGCGAGAGATAATCACGGCGTCTCCAGAGAATGACTGGCTATGGATCTTTTACAGAC
 TTTAGAAGTGCCAAAATGACGTACCTATCCCTCAATTTACCAGTCTCATCTTCTACTCCAGAGGGTT
 GAGAGAAAACCTATCTAAGAGTATGAGAGATAACCTGCCACAATTGAGTCTTTGATGAGGCAGGTGCTG
 GCGGGCACGGAGAAGATACCTTAGAGTCAGACGACAACTCAACGACTGCTAAAAGACTCTTTACGA
 AGGACAAGATGGGTGGATCAAGAGGTGCGCATGCGACTAGAACCATGACTGGAGATTACAGCCCCAAC
 AAGAAGGTGTCCCGTAAGGTAGGATGTTTCAAGATGGGTCTGCTCTGCTCAACAGGTTGCAGTCTTACC

TCAGCAAACCCGGCCCCCTGTCTCGGAGCTTGACATAAGGGCCCTCTCTAAGAGGTTCCAGAACCCTTTG
 ATCTCGGGCTTGAGAGTGGTTCAGTGGGCAACCGGTGCTCATTATAAGCTTAAGCCTATTCTAGATGAT
 CTCAATGTTTTCCCATCTCTCTGCTTGTAGTTGGGGACGGGTGAGGGGGGATATCAAGGGCAGTCCTC
 AACATGTTTTCCAGATGCCAAGCTTGTGTTCAACAGTCTTTTAGAGGTGAATGACCTGATGGCTTCCGGA
 ACACATCCACTGCCTCCTTCAGCAATCATGAGGGGAGGAAATGATATCGTCTCCAGAGTGATAGATCTT
 GACTCAATCTGGGAAAAACCGTCCGACTTGAGAACTTGGCAACCTGGAAATACCTCCAGTCAGTCCAA
 AAGCAGGTCAACATGTCTATGACCTCATTATTTGCGATGCAGAAGTTACTGACATTGCATCTATCAAC
 CGGATCACCTGTAAATGTCCGATTTTGCATTGTCTATAGATGGACCACTCTATTTGGTCTTCAAACT
 TATGGGACTATGCTAGTAAATCCAACTACAAGGCTATTCAACACCTGTCAAGAGCGTTCCTTCGGTC
 ACAGGGTTTATCACCCAAGTAACTTCGTCTTTTTTCATCTGAGCTCTACCTCCGATTCTCCAAACGAGGG
 AAGTTTTTTCAGAGATGCTGAGTACTTGACCTCTTCCACCCTTCGAGAAATGAGCCTTGTGTTATTCAAT
 TGTAGCAGCCCCAAGAGTGAGATGCAGAGAGCTCGTTCCTTGAACATATCAGGATCTTGTGAGAGGATTT
 CCTGAAGAAATCATATCAAATCCTTACAATGAGATGATCATAACTCTGATTGACAGTGATGTAGAATCT
 TTTCTAGTCCACAAGATGGTTGATGATCTTGAGTTACAGAGGGGAACCTCTGTCTAAAGTGGCTATCATT
 ATAGCCATCATGATAGTTTTCTCCAACAGAGTCTTCAACGTTTCCAAACCCCTAACTGACCCCTCGTTC
 TATCCACCGTCTGATCCCAAAATCCTGAGGCACTTCAACATATGTTGCAGTACTATGATGTATCTATCT
 ACTGCTTTAGGTGACGTCCCTAGCTTCGCAAGACTTCACGACCTGTATAACAGACCTATAACTTATTAC
 TTCAGAAAGCAAGTCATTCGAGGGAACGTTTATCTATCTTGGAGTTGGTCCAACGACACCTCAGTGTTT
 AAAAGGGTAGCCTGTAATTCIAGCCTGAGICTGTATCTCACTGGATCAGGTTGATTTACAAGATAGTG
 AAGACTACCAGACTCGTTGGCAGCATCAAGGATCTATCCAGAGAAGTGGAAAGACACCTTCATAGGTAC
 AACAGGTGGATCACCTAGAGGATATCAGATCTAGATCATCCCTACTAGACTACAGTTGCCTGTGAACC
 GGATACTCCTGGAAGCCTGCCCATGCTAAGACTCTTGTGTGATGTATCTTGAAAAAACAAGATCCTAA
 ATCTGAACCTTTGGTTGTTTGATTGTTTTCTCAtttttgttgtttatttgttaagcgt

REIVINDICACIONES

1. Un vector del virus de la rabia recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma.
- 5 2. El vector del virus de la rabia recombinante de la reivindicación 1, en donde la al menos una glicoproteína de filovirus es una glicoproteína del virus del Ébola.
3. Una célula huésped que comprende el vector del virus de la rabia recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. Viriones aislados, preparados a partir de células huéspedes infectadas con el vector del virus de la rabia recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 10 5. Una vacuna multivalente, eficaz para proteger tanto frente a la rabia como a filovirus, que comprende un vector del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma.
6. La vacuna multivalente de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la al menos una glicoproteína de filovirus es una glicoproteína del Ébola.
- 15 7. Una célula huésped que comprende la vacuna multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6.
8. Viriones aislados, preparados a partir de células huéspedes infectadas con la vacuna multivalente de la reivindicación 7.
9. Una composición de vacuna que comprende una o más vacunas multivalentes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 20 10. Una vacuna de virus que comprende un vector del virus de la rabia recombinante atenuado que expresa la glicoproteína del Ébola, en donde la vacuna de virus protege tanto frente a una infección por el virus de la rabia como una infección del virus del Ébola.
- 25 11. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna multivalente que comprende un vector del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma, para uso en un método de inducir una respuesta inmune que protege frente a un filovirus y a un virus de la rabia en un sujeto.
- 30 12. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna multivalente que comprende un vector del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma, para uso en un método de inducir anticuerpos neutralizantes contra un filovirus y/o un virus de la rabia en un sujeto infectado con, o que ha estado expuesto a uno o a ambos de dichos virus.
13. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna multivalente que comprende un vector del virus de la rabia recombinante que expresa al menos una glicoproteína de filovirus o un fragmento inmunogénico de la misma, en donde dicha vacuna induce una respuesta inmune eficaz contra uno o ambos de dichos virus, para uso en un método de tratar a un sujeto infectado con un filovirus y/o un virus de la rabia.
- 35 14. Un vector basado en un virus de la rabia, vivo y competente para la replicación que expresa una glicoproteína del Ébola.
15. Un vector basado en un virus de la rabia, vivo y deficiente en la replicación que expresa una glicoproteína del Ébola.

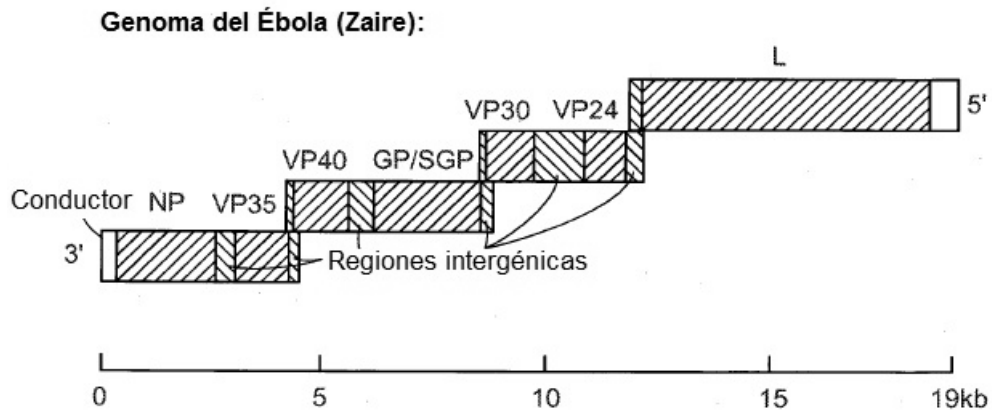
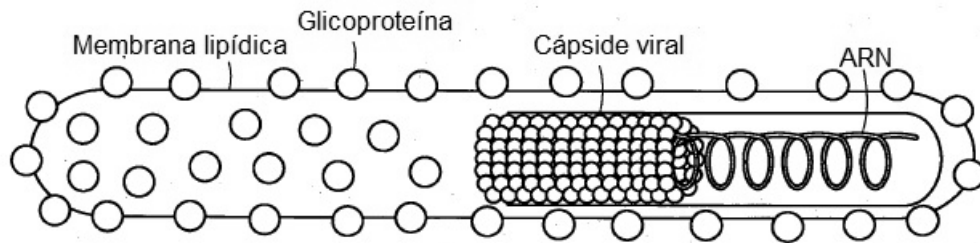


FIG. 1



Takada, A. et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. PNAS 1997: 197;14764-14769

FIG. 2

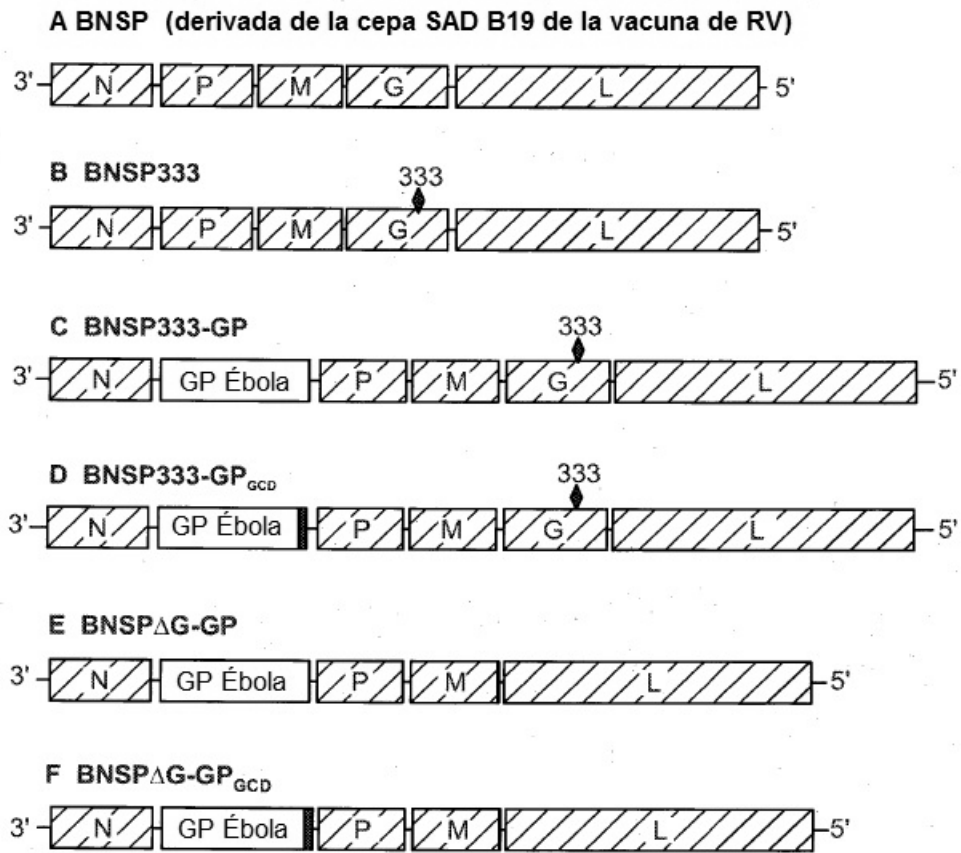


FIG. 3

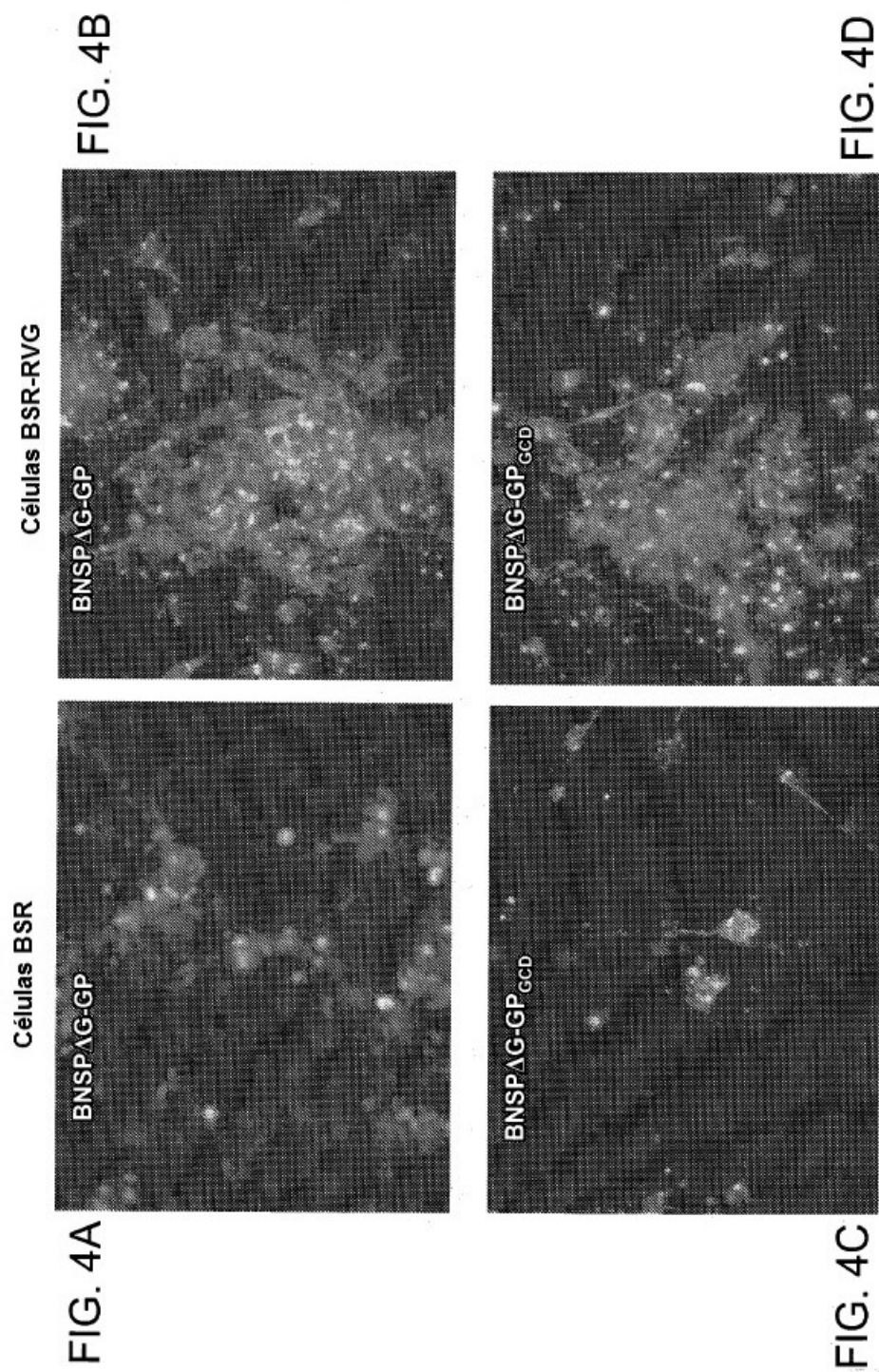


FIG. 5A

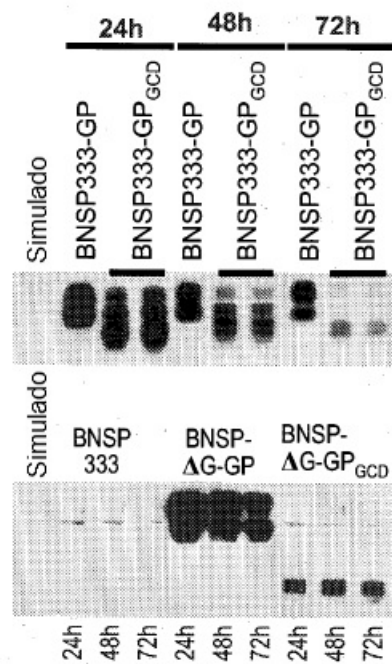


FIG. 5B

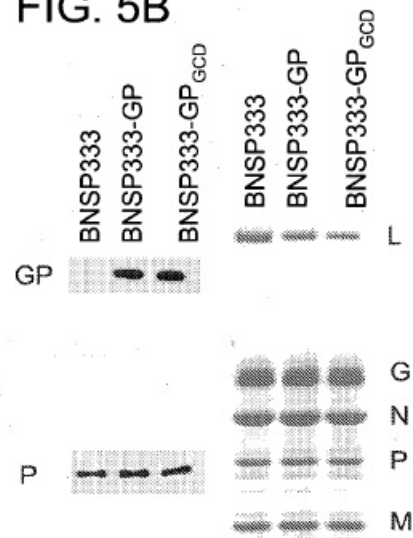


FIG. 5C

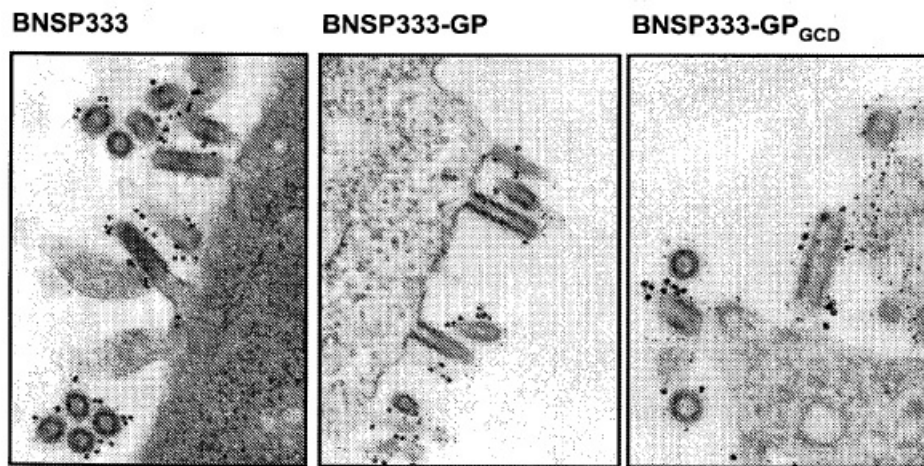


FIG. 6A

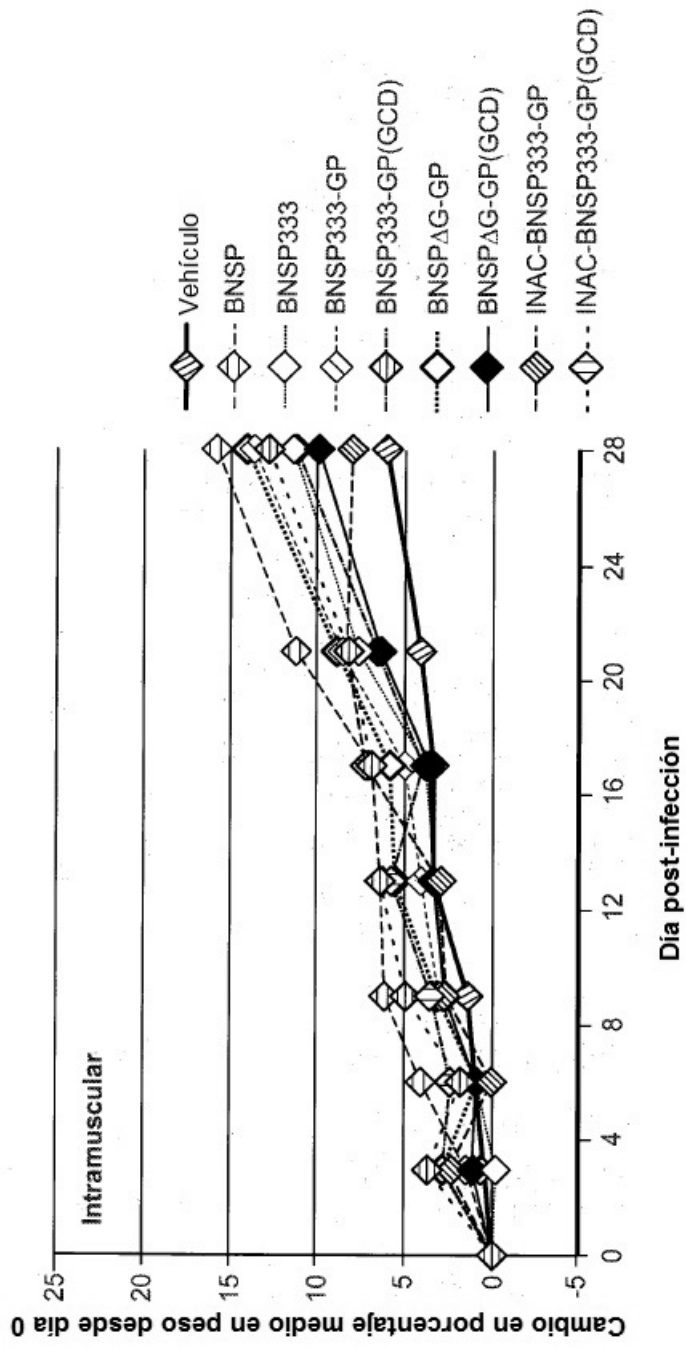
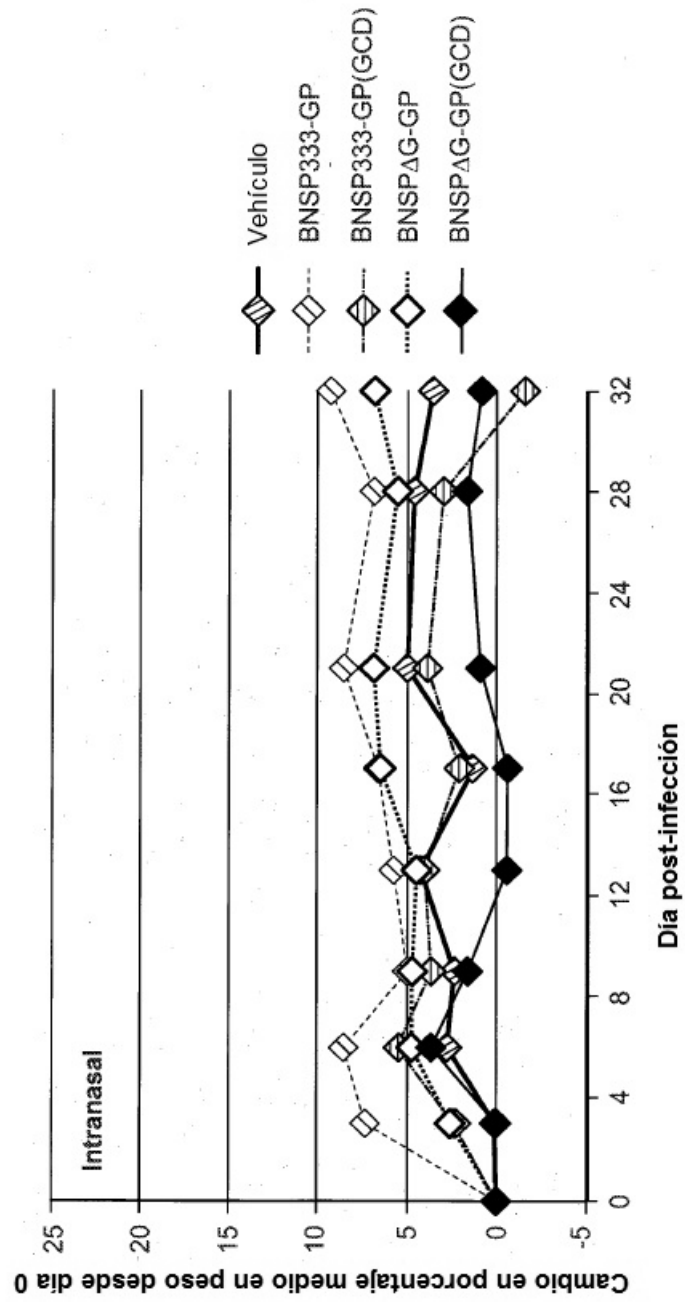


FIG. 6B



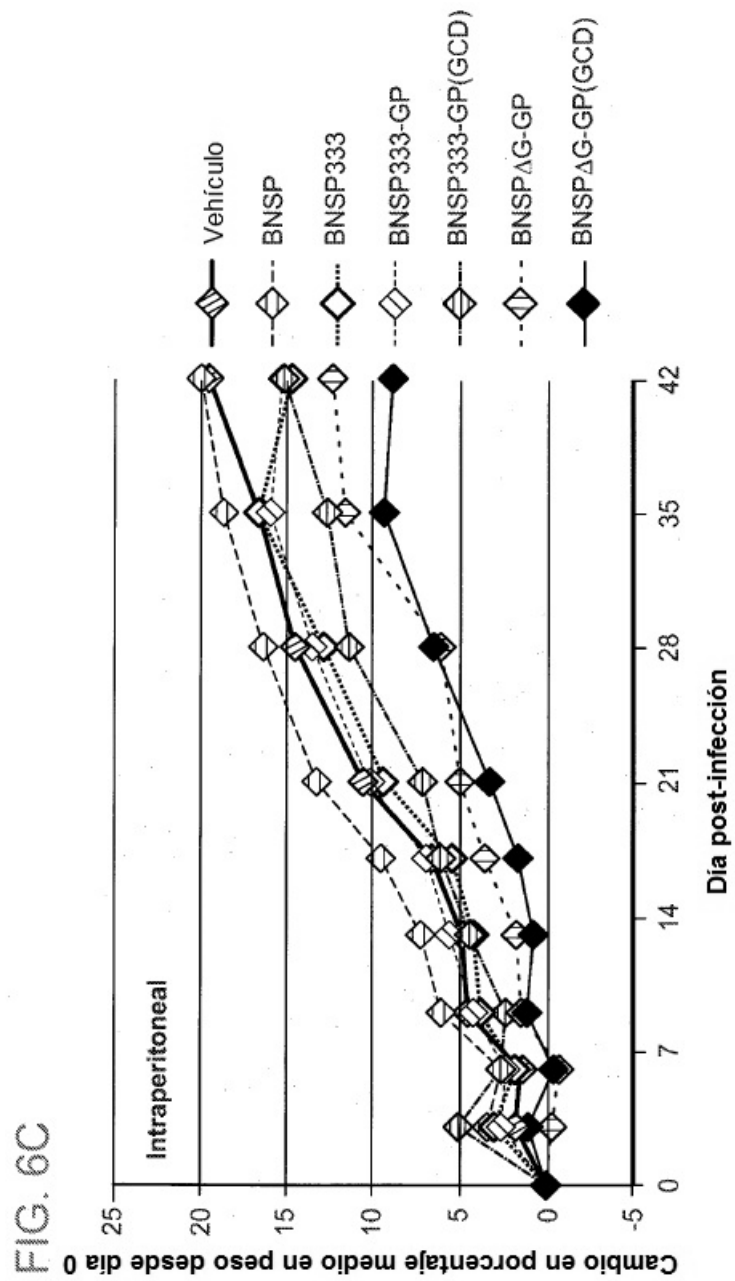


FIG. 7A

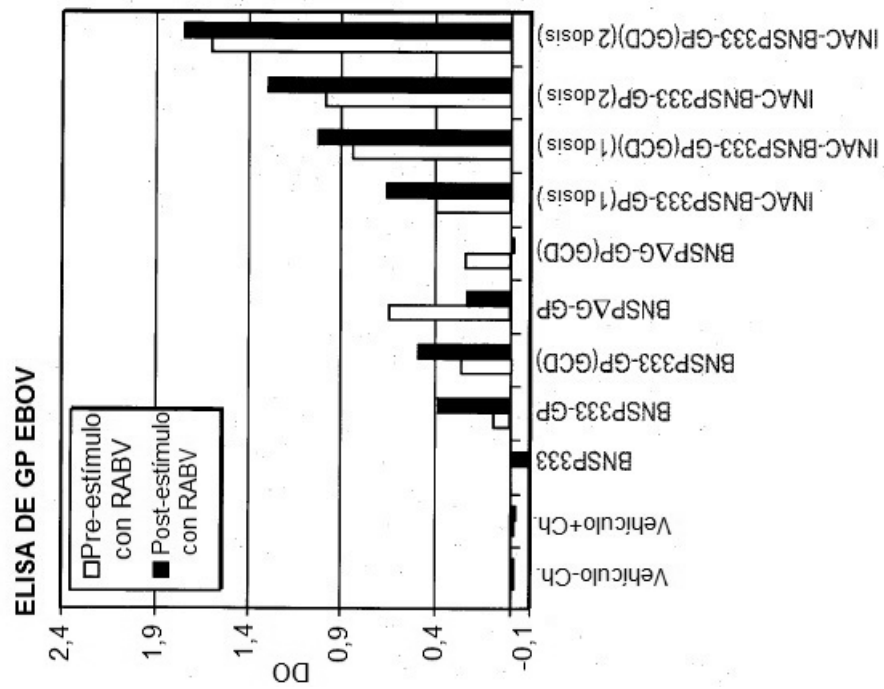


FIG. 7B

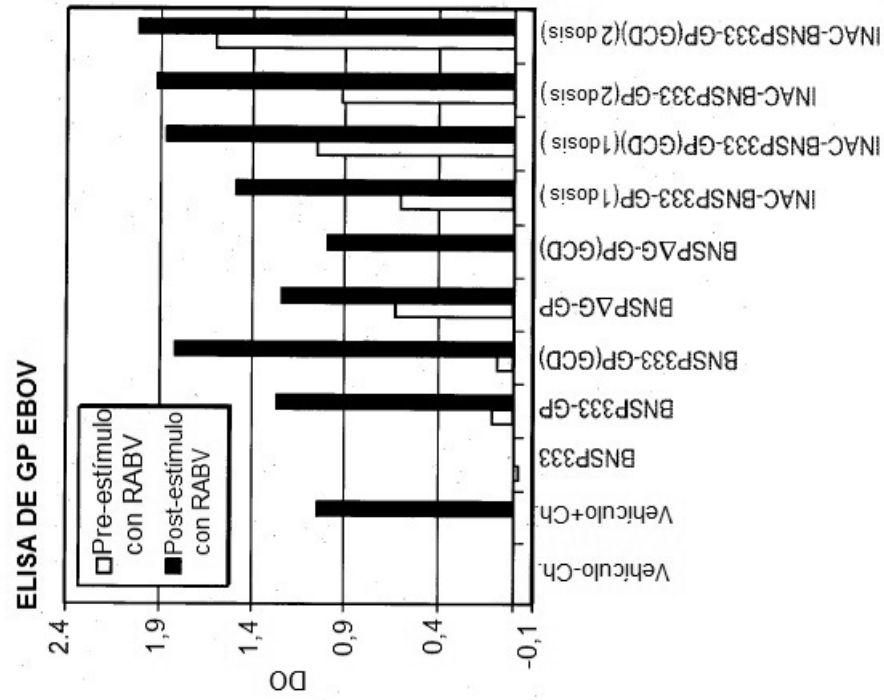


FIG. 7D

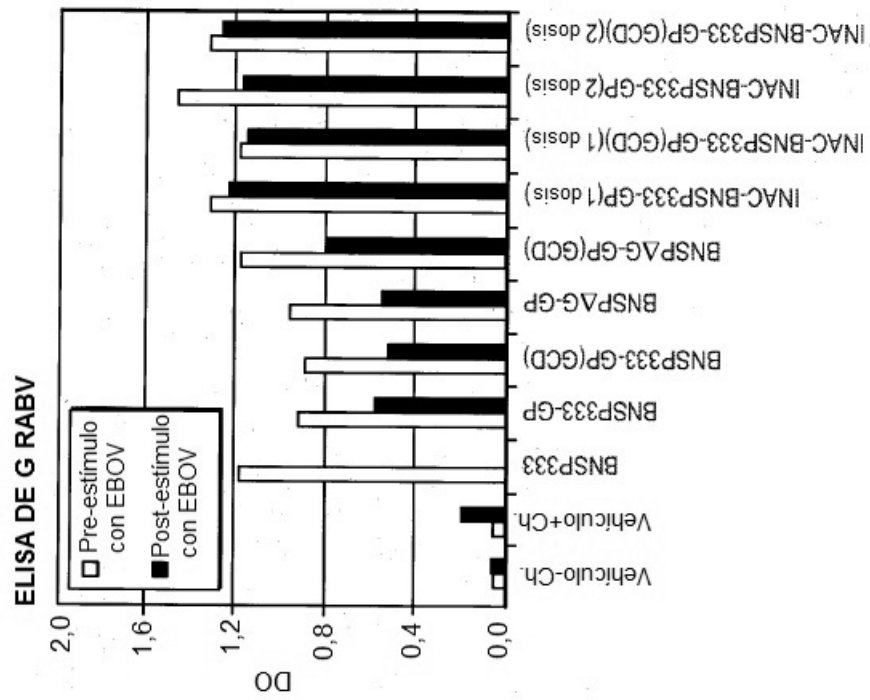


FIG. 7C

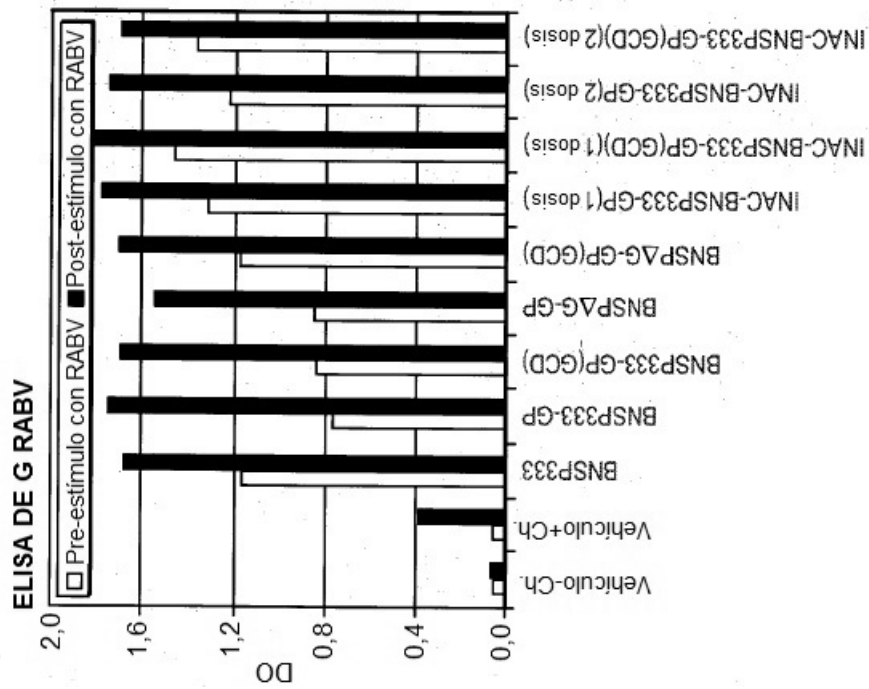


FIG. 8A

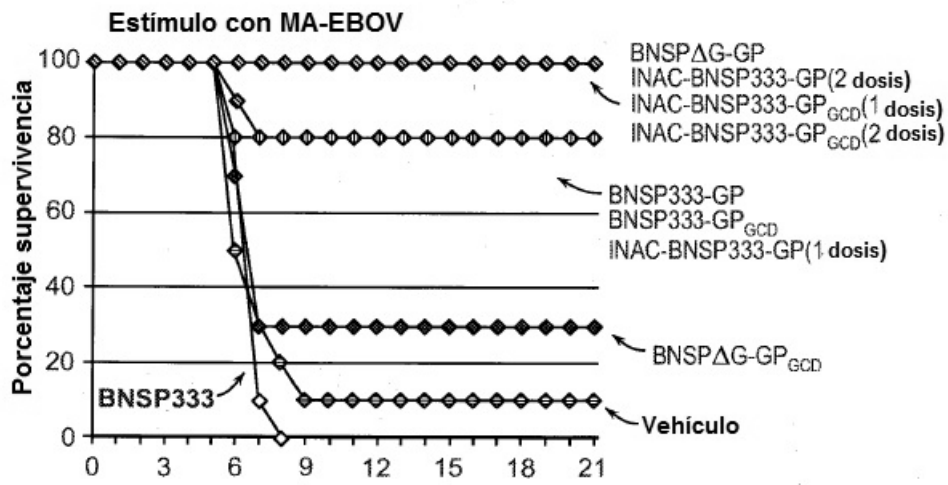
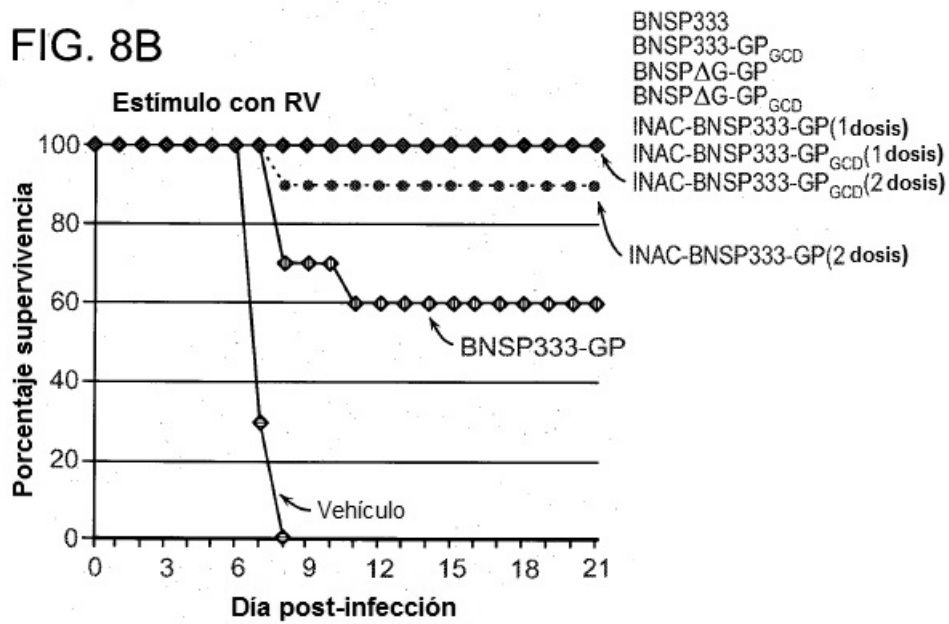


FIG. 8B



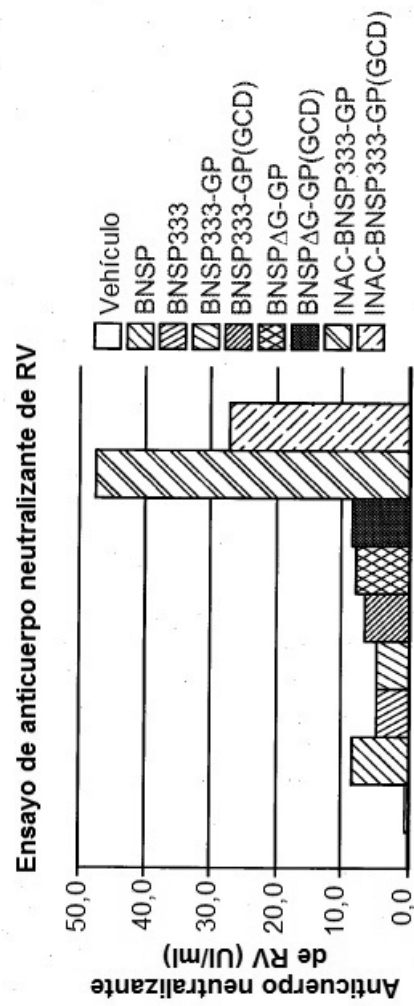


FIG. 9

FIG. 10A

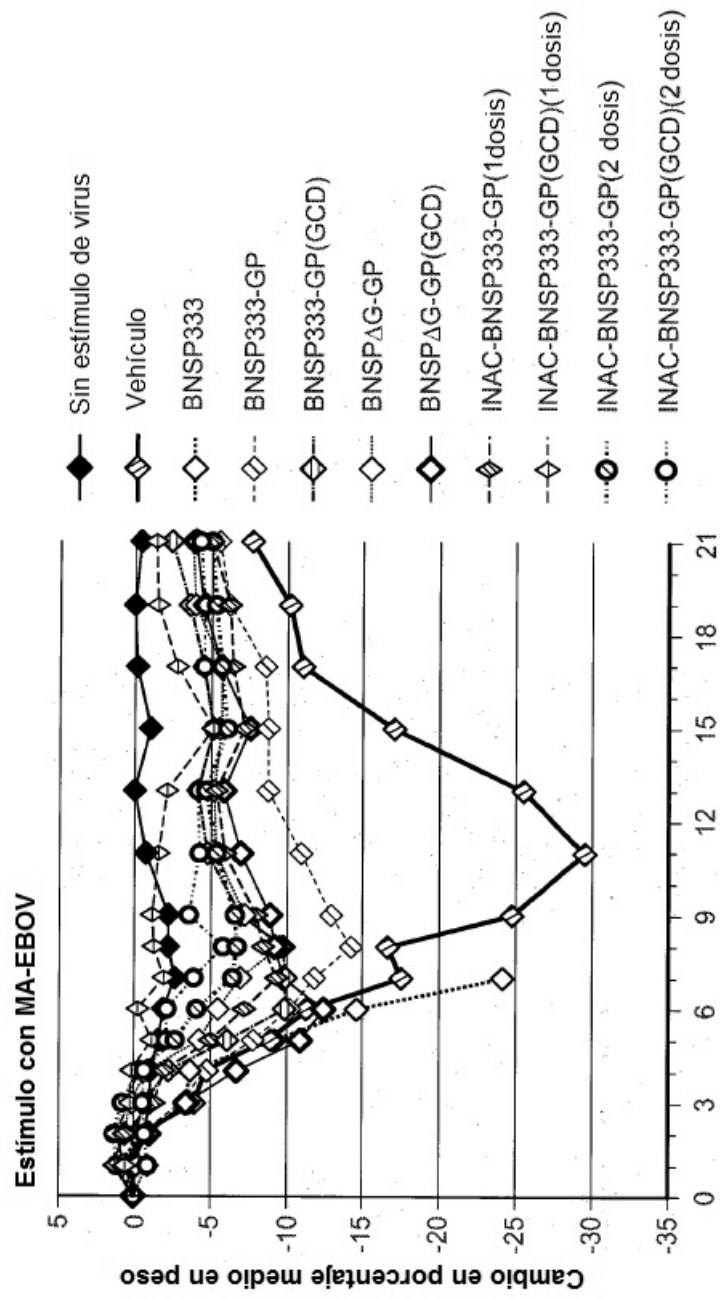


FIG. 10B

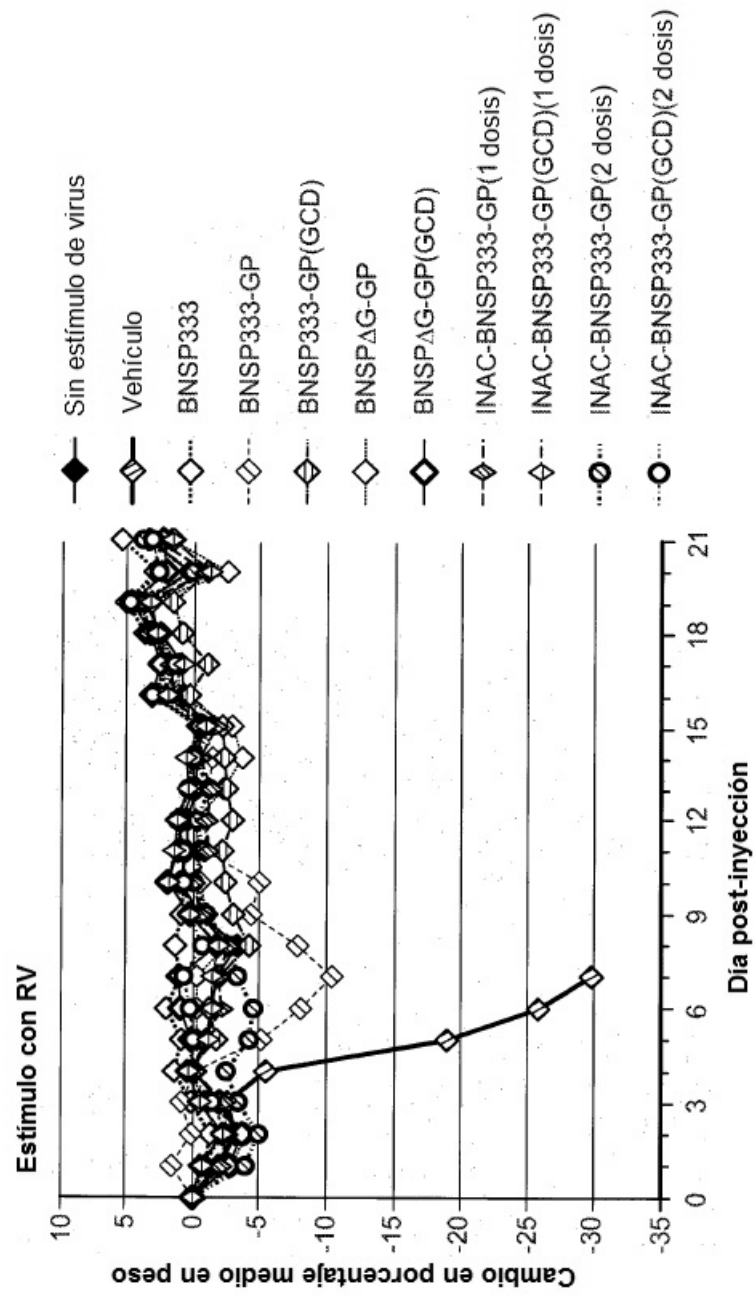


FIG. 11A

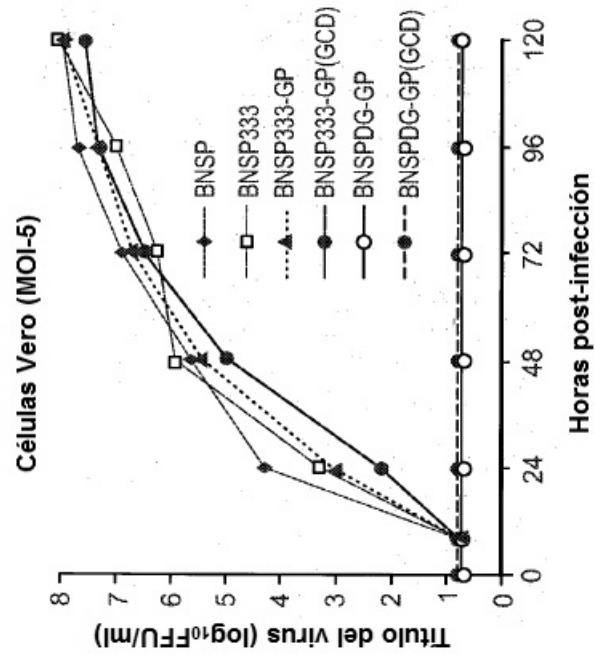


FIG. 11B

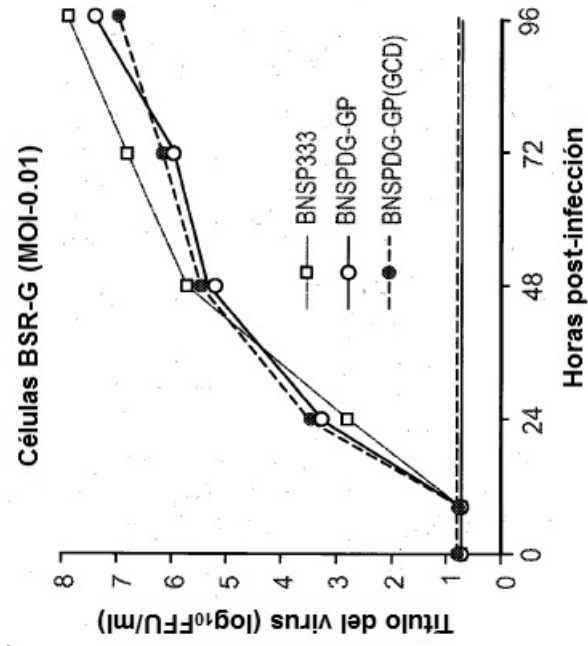


FIG. 12A

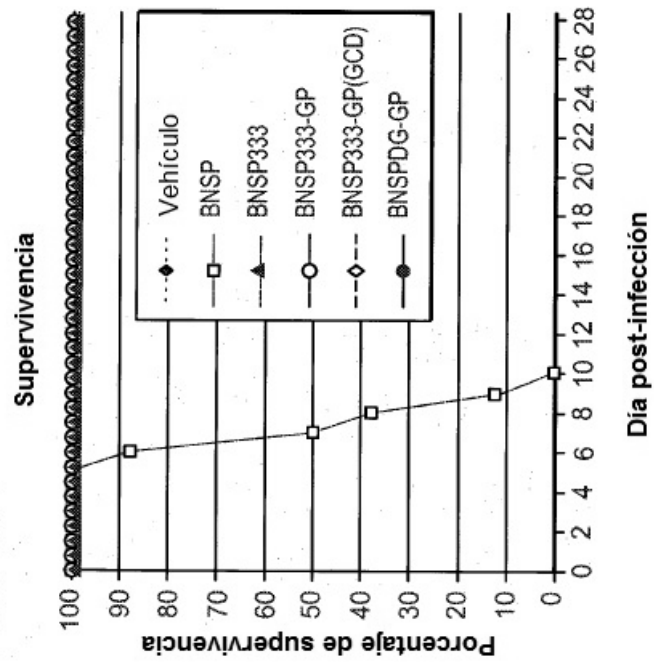


FIG. 12B

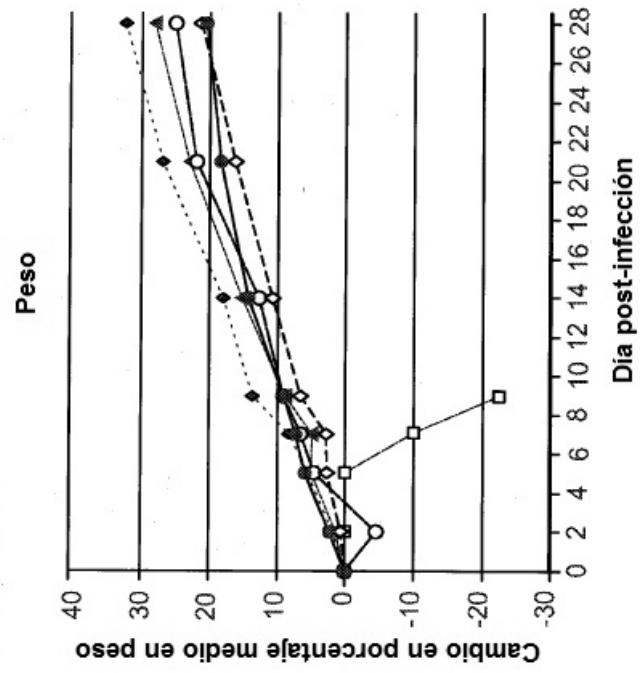
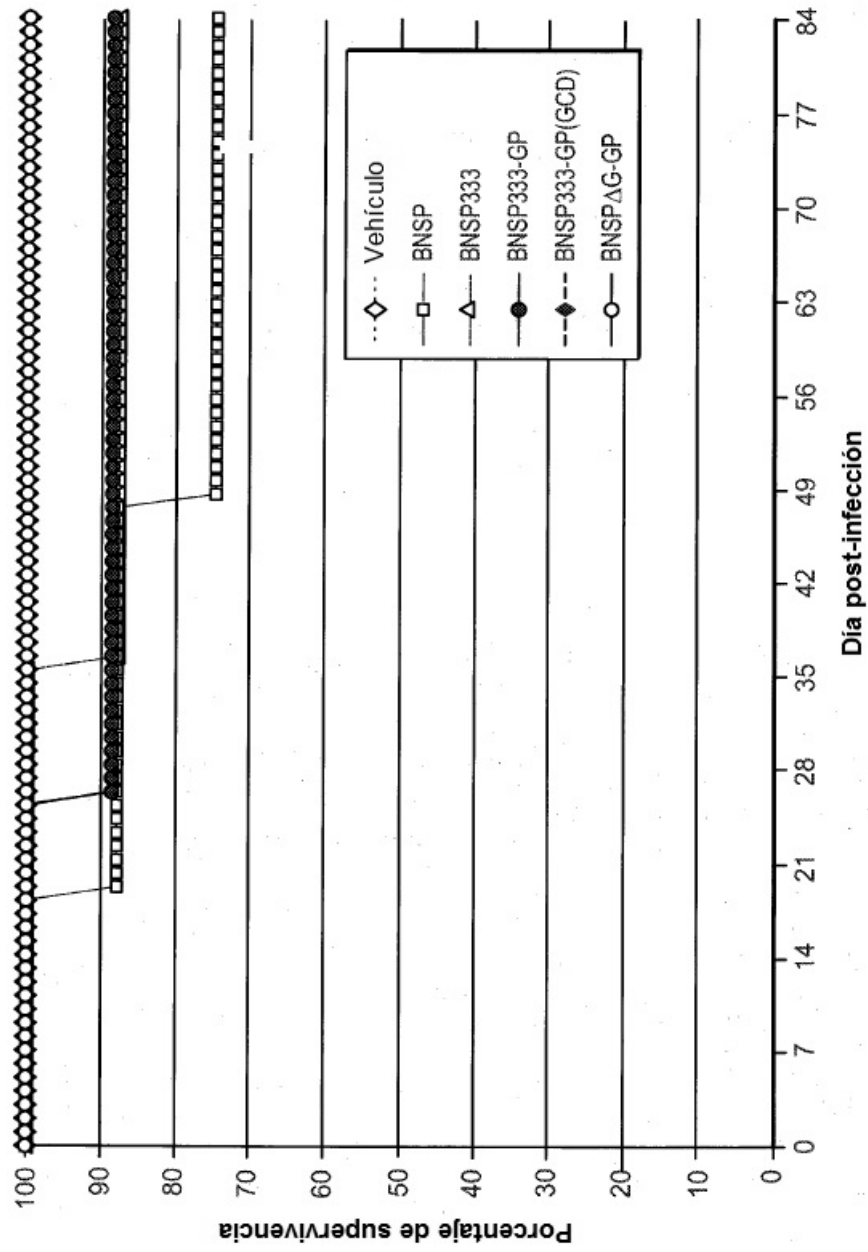
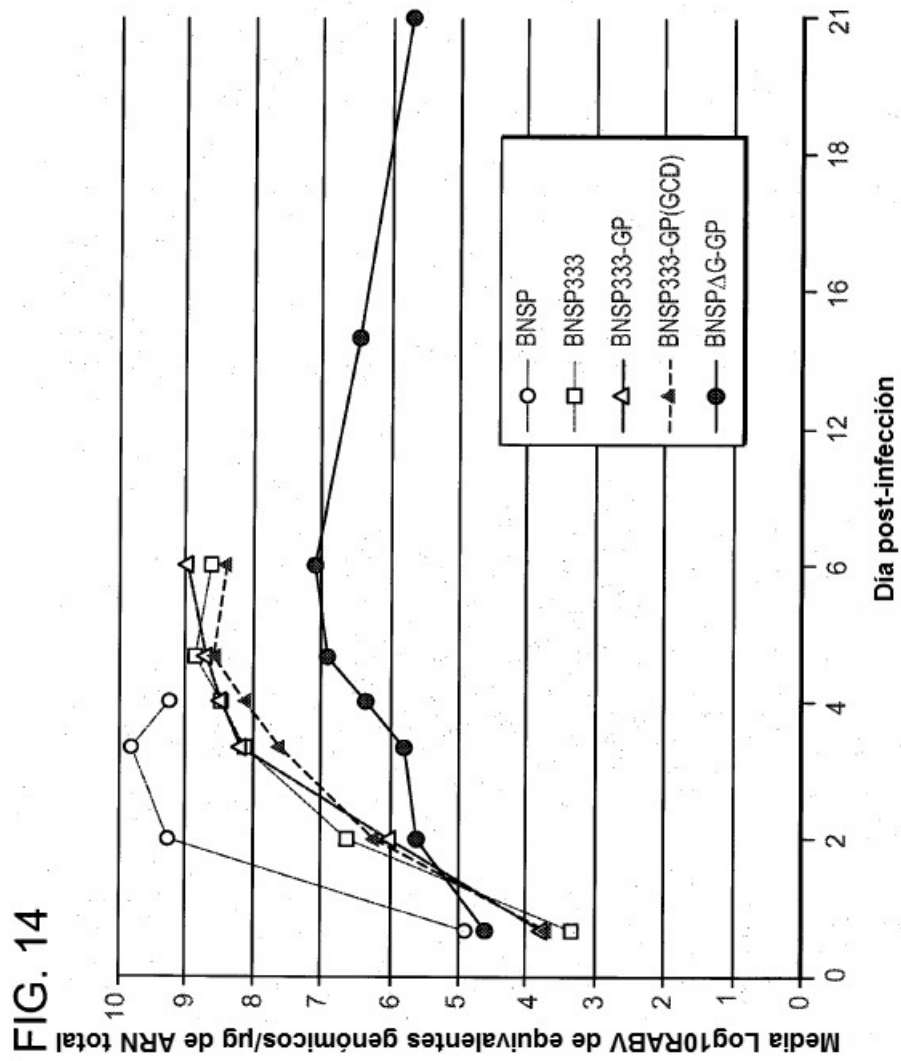


FIG. 13





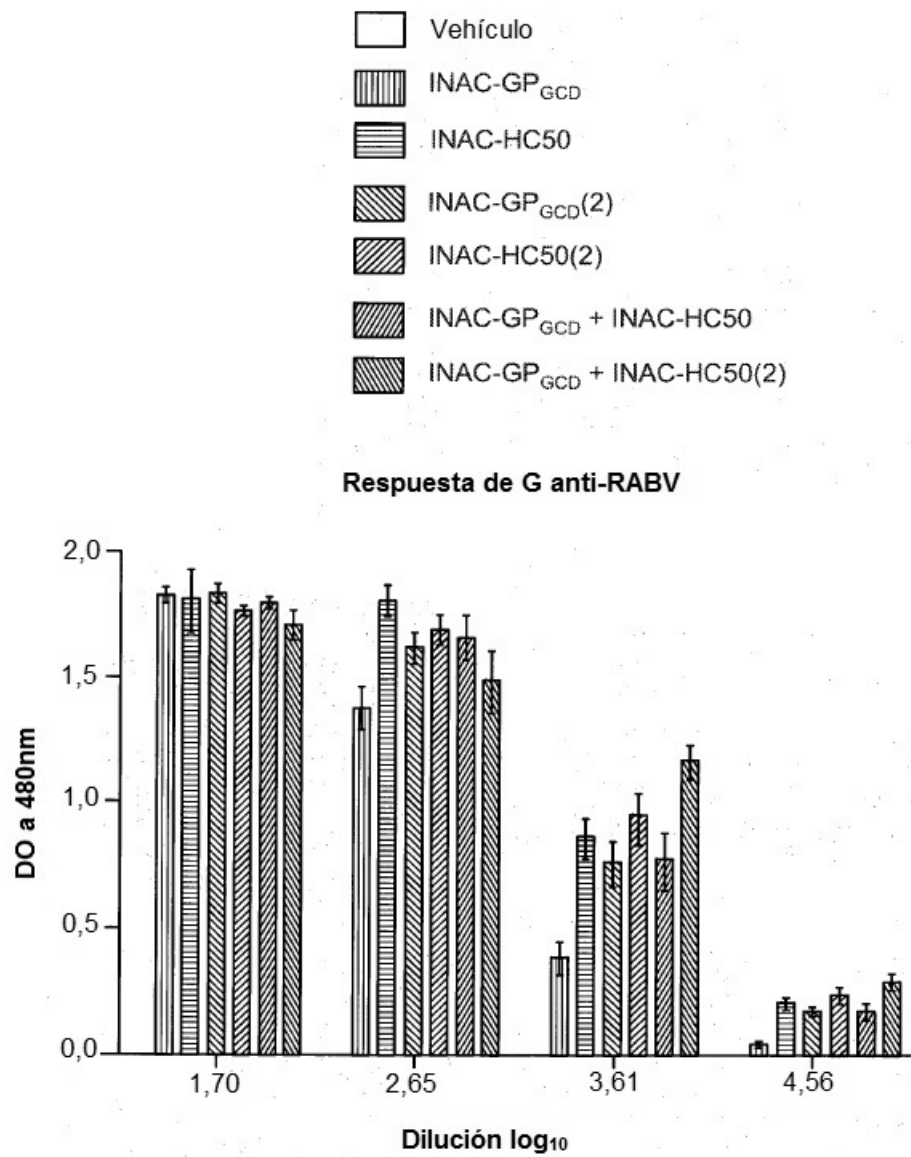


FIG. 15A

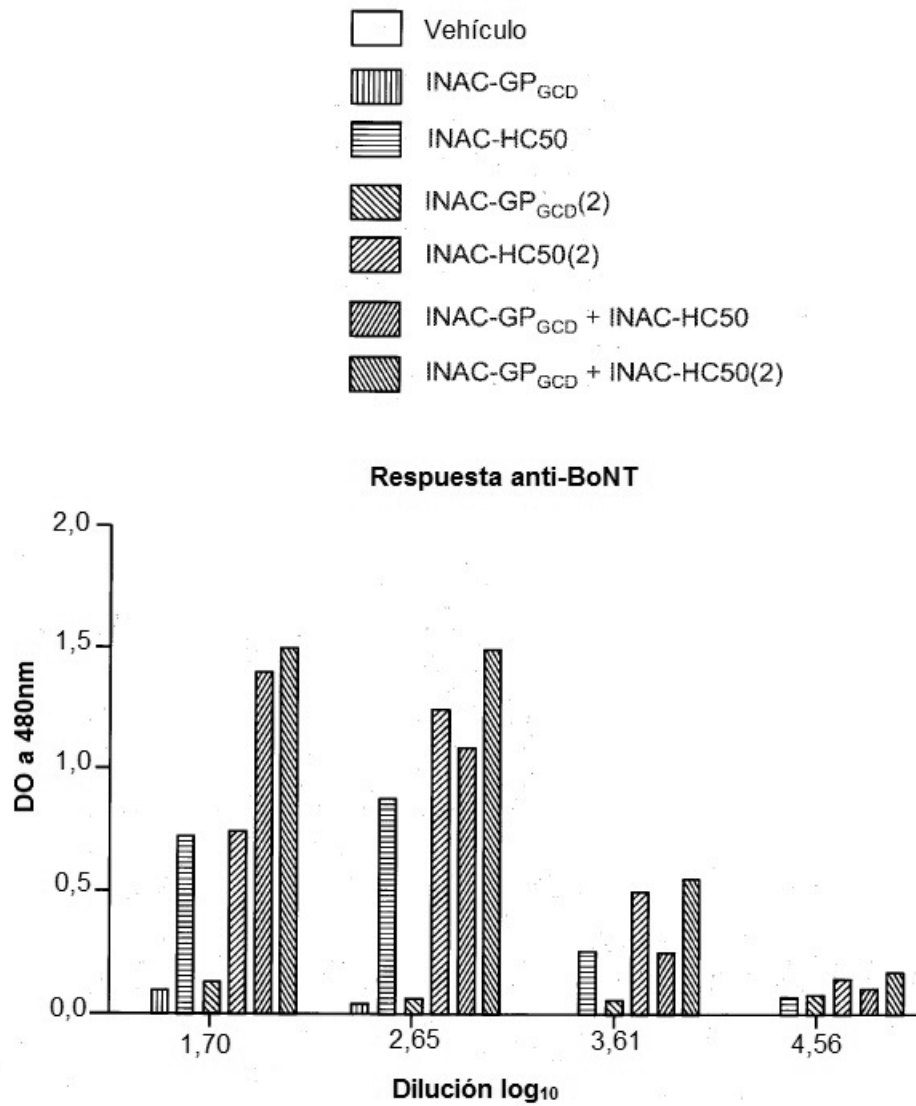


FIG. 15B

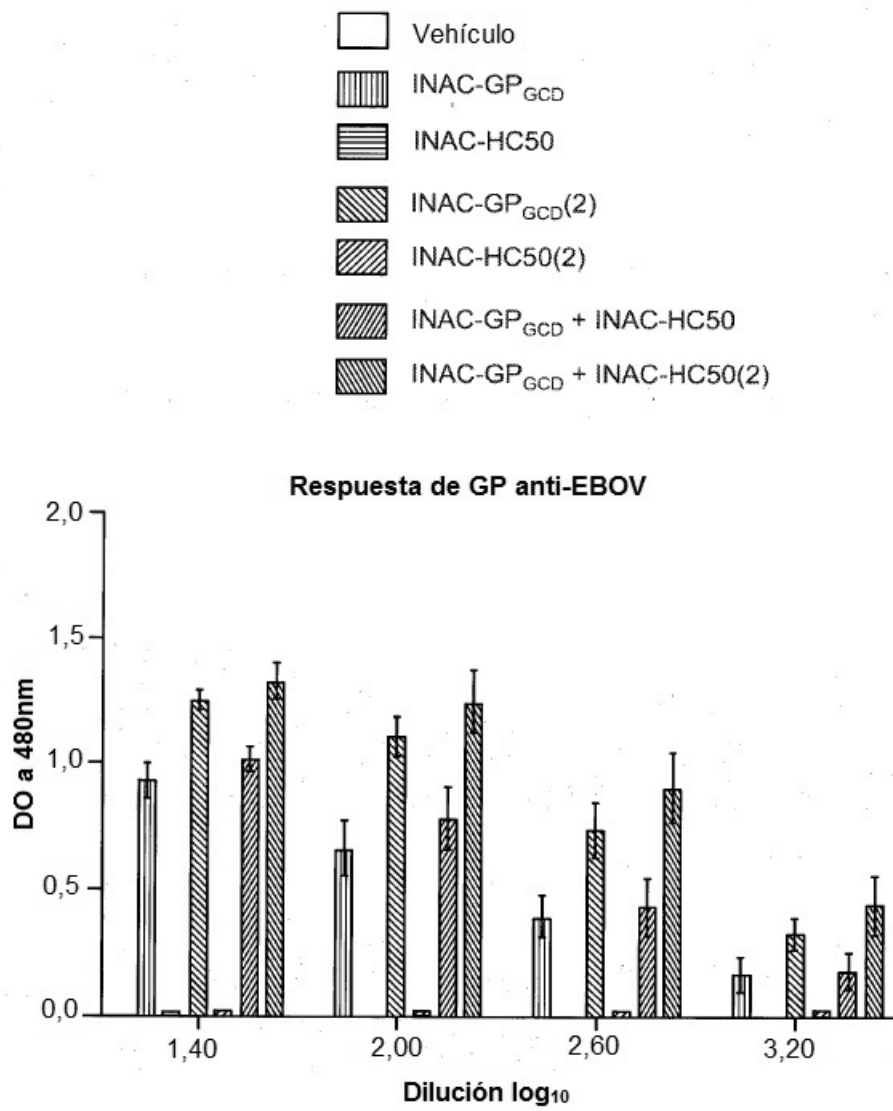


FIG. 15C

FIG. 16A

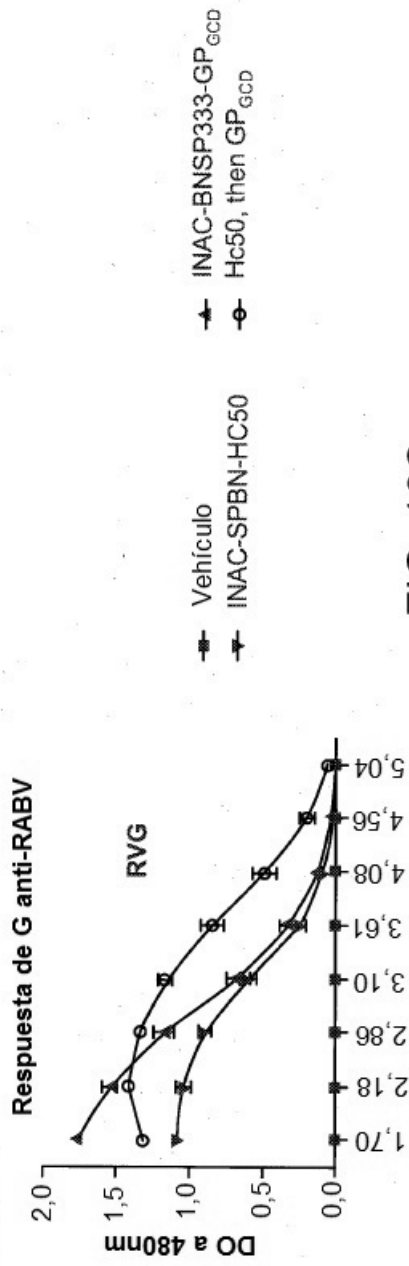


FIG. 16C

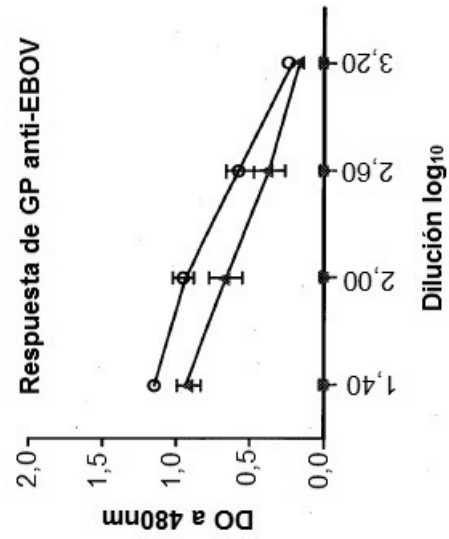


FIG. 16B

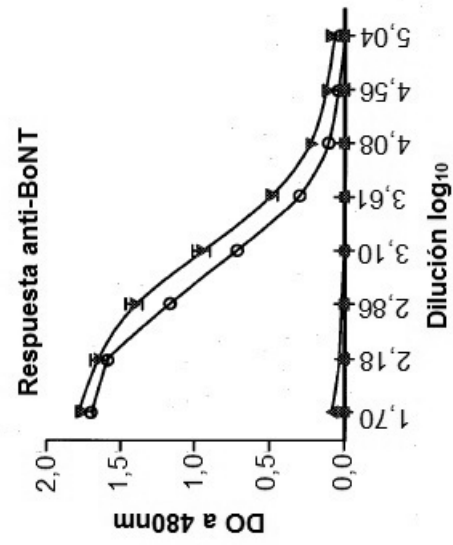


FIG. 17A

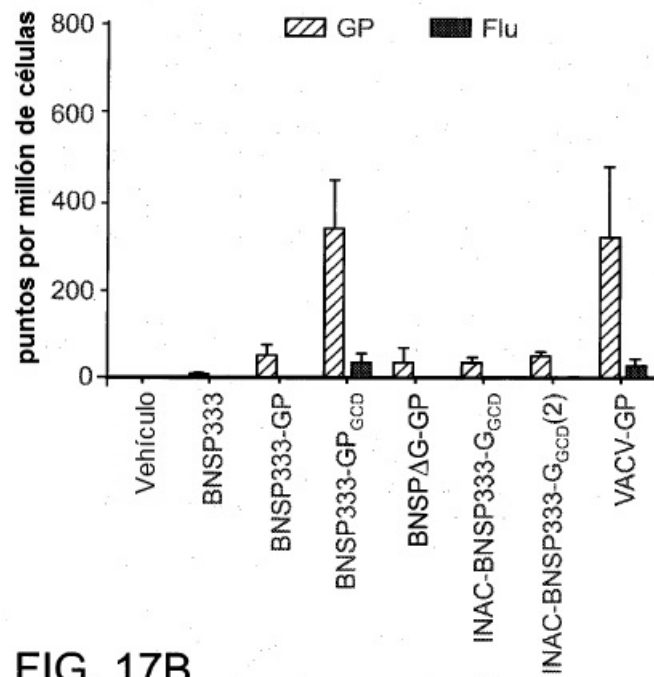


FIG. 17B

