

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 892**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/04** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 35/761** (2015.01)  
**A61K 35/763** (2015.01)  
**A61K 35/766** (2015.01)  
**A61K 35/768** (2015.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2007 E 07875168 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2064229**

54 Título: **Rhabdovirus oncolítico**

30 Prioridad:

**15.09.2006 US 844726 P**

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

**24.11.2015**

73 Titular/es:

**OTTAWA HEALTH RESEARCH INSTITUTE  
(100.0%)  
725 PARKDALE AVENUE  
OTTAWA, ONTARIO K1Y 4E9, CA**

72 Inventor/es:

**STOJDL, DAVID;  
BROWN, CHRISTOPHER y  
BELL, JOHN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 551 892 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

Rhabdovirus oncolítico

5 **Antecedentes de la invención****I. Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere en líneas generales a virología y medicina. En ciertos aspectos la invención se refiere a virus oncolíticos, particularmente rhabdovirus oncolíticos no VSV y rhabdovirus oncolíticos que comprende una glucoproteína no VSV.

**II. Antecedentes**

15 Varios virus han demostrado replicarse en y eliminar una amplia diversidad de células tumorales *in vitro* (virus Sindbis (Unno *et al.*, 2005); virus Sendai (Kinoh *et al.*, 2004); virus Coxsackie (Shafren *et al.*, 2004); virus del Herpes simple (Mineta *et al.*, 1995); Parvovirus (Abschuetz *et al.*, 2006); Adenovirus (Heise *et al.*, 2000); Polio virus (Gromeier *et al.*, 2000); virus de la enfermedad de Newcastle (Sinkovics y Horvath, 2000); virus de la estomatitis Vesicular (Stojdl *et al.*, 2000); virus del sarampión (Grote *et al.*, 2001); Reovirus (Coffey *et al.*, 1998); Retrovirus (Logg *et al.*, 2001); Vaccinia (Timiryasova *et al.*, 1999); e Influenza (Bergmann *et al.*, 2001)). Además, dichos virus han mostrado eficacia en el tratamiento de modelos animales de cáncer.

25 El virus de la estomatitis vesicular (VSV), un rhabdovirus bien conocido y bien estudiado, ha demostrado eliminar líneas celulares tumorales en experimentos de cultivo celular, y ha mostrado eficacia en diversos modelos de cáncer en roedor (Stojdl *et al.*, 2000; Stojdl *et al.*, 2003). Sin embargo, VSV no elimina todas las células cancerosas.

30 El documento EP 1 218 019 describe el uso de un virus para la fabricación de un medicamento para reducir la viabilidad de una célula tumoral, donde el virus es una cepa atenuada de virus de la estomatitis vesicular y donde la célula tumoral es una célula cancerosa hematopoyética, un melanoma, un sarcoma, un tumor neuroendocrino, un carcinoma pulmonar o un carcinoma de colon.

35 El documento US 2004/170607 A1 describe un método para reducir la viabilidad de una célula tumoral que implica administrar un virus que no es un patógeno humano común a la célula tumoral. Preferiblemente, el virus muestra susceptibilidad diferencial, porque las células normales no se ven afectadas por el virus. Esta susceptibilidad diferencial es más pronunciada en presencia de interferón. La célula tumoral se caracteriza porque tiene bajos niveles, o ausencia, de actividad PKR, o porque es PKR-/-, STAT1-/- o tanto PKR-/- como STAT1-/-. El virus se selecciona entre el grupo que consiste en Rhabdovirus y picornavirus, y preferiblemente es el virus de la estomatitis vesicular (VSV) o un derivado del mismo.

40 **Sumario de la invención**

45 Varios rhabdovirus recién identificados son mucho más eficaces en la eliminación de cánceres particulares o líneas celulares cancerosas que VSV. Además, VSV y mutantes atenuados de VSV son neurovirulentos y causan patología del SNC en roedores y primates. Varios rhabdovirus no infectan el SNC (es decir, Muir Springs y Bahía Grande: Kerschner *et al.*, 1986), y muestran un perfil de seguridad más aceptable. Además, las terapias basadas en los nuevos rhabdovirus pueden usarse para tratar cánceres del SNC, tanto primarios como secundarios. Los rhabdovirus de la invención (y/u otros agentes oncolíticos) pueden usarse en sucesión para evitar la respuesta inmune del hospedador contra uno o más virus terapéuticos particulares. Esto permitiría una terapia prolongada y mejoraría la eficacia.

50 La presente invención se refiere a un rhabdovirus oncolítico para su uso en el tratamiento del cáncer, donde el rhabdovirus oncolítico codifica:

- 55 (a) una proteína G que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 5, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 5,  
 (b) una proteína N que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2;  
 (c) una proteína M que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4;  
 60 (d) una proteína P que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 3, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 3, o  
 (e) una proteína L que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 6, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 6.

65 La presente invención también se refiere a un rhabdovirus oncolítico que codifica

- (a) una proteína G que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 5, o

que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 5,

(b) una proteína N que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2;

(c) una proteína M que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4;

5 (d) una proteína P que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 3, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 3, o

(e) una proteína L que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 6, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 6.

10 Dichos rhabdovirus poseen propiedades de eliminación de células tumorales *in vitro* e *in vivo*.

Como se usa en este documento, un rhabdovirus no VSV incluye uno o más de los siguientes virus o variantes de los mismos: virus Arajás, virus Chandipura, virus Cocal, virus Isfahan, virus Maraba, virus Piry, virus Alagoas de la estomatitis vesicular, virus BeAn 157575, virus Boteke, virus Calchaqui, virus de la anguila americana, virus Gray Lodge, virus Jurona, virus Klamath, virus Kwatta, virus La Joya, virus Malpais Spring, virus del murciélago de Mount Elgon, virus Perinet, virus Tupaia, Farmington, virus Bahia Grande, virus Muir Springs, virus Reed Ranch, virus Hart Park, virus Flanders, virus Kamese, virus Mosqueiro, virus Mossuril, virus Barur, virus Fukuoka, virus Kern Canyon, virus Nkolbisson, virus Le Dantec, virus Keuraliba, virus Connecticut, virus New Minto, virus Sawgrass, virus Chaco, virus Sena Madureira, virus Timbo, virus Almpiwari, virus Aruac, virus Bangoran, virus Bimbo, virus Bivens Arm, virus del cangrejo azul, virus Charleville, virus de la planicie costera, virus DakArk 7292, virus Entamoeba, virus Garba, virus Gossas, virus Humpty Doo, virus Joinjakaka, virus Kannamangalam, virus Kolongo, virus Koolpinyah, virus Kotonkon, virus Landjia, virus Manitoba, virus Marco, virus Nasoule, virus Navarro, virus Ngaingan, virus Oak-Vale, virus Obodhiang, virus Oita, virus Ouango, virus Parry Creek, virus de los cíclidos de Rio Grande, virus Sandjimba, virus Sigma, virus Sripur, virus Sweetwater Branch, virus Tibrogargan, virus Xiburema, virus Yata, Rhode Island, virus del Río Adelaide, virus Berrimah, virus Kimberley, o virus de la fiebre efímera bovina. En ciertos aspectos, rhabdovirus no VSV puede referirse al subgrupo de Dimarhabdovirus (definido como rhabdovirus capaz de infección tanto de células de insecto como de mamífero). En realizaciones específicas, el rhabdovirus no es VSV. En aspectos particulares el rhabdovirus no VSV es un virus Carajas, virus Maraba, Farmington, virus Muir Springs, y/o virus Bahia Grande, incluyendo variantes de los mismos.

30 El rhabdovirus oncolítico para su uso de acuerdo con la presente invención puede usarse en métodos de tratamiento del cáncer que incluyen un segundo virus terapéutico, tal como un virus oncolítico o deficiente en la replicación. Oncolítico normalmente se refiere a un agente que es capaz de eliminar, lisar, o detener el crecimiento de una célula cancerosa. En términos de un virus oncolítico el término se refiere a un virus que puede replicarse en algún grado en una célula cancerosa, causar la muerte, lisis, o cese de crecimiento de la célula cancerosa y normalmente tiene efectos tóxicos mínimos sobre células no cancerosas. Un segundo virus incluye, aunque sin limitación, un adenovirus, un virus vaccinia, un virus de la enfermedad de Newcastle, un alfavirus, un parvovirus, un herpes virus, un rhabdovirus, un rhabdovirus no VSV y similares. En otros aspectos, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable. La composición también puede incluir un segundo agente antineoplásico, tal como un agente quimioterapéutico, radioterapéutico, o inmunoterapéutico.

45 El rhabdovirus oncolítico para su uso de acuerdo con la presente invención puede usarse en métodos que incluyen el tratamiento de un paciente con cáncer, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de una composición de rhabdovirus oncolítico.

50 En ciertos aspectos de la invención, una célula puede estar comprendida en un paciente y puede ser una célula hiperproliferativa, neoplásica, pre-cancerosa, cancerosa, metastásica, o metastatizada. De acuerdo con la descripción, un rhabdovirus no VSV para su uso en un método de tratamiento del cáncer puede administrarse a un paciente que tenga una célula susceptible a eliminación por al menos un rhabdovirus no VSV o un régimen terapéutico o composición que incluye un rhabdovirus no VSV. La administración de las composiciones terapéuticas puede hacerse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más rhabdovirus no VSV o rhabdovirus no VSV recombinantes, solos o en diversas combinaciones. La composición administrada puede tener 10, 100, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup>, 10<sup>13</sup>, 10<sup>14</sup>, o más partículas virales o unidades formadoras de placas (pfu). La administración puede ser por administración intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, o intranasal. En ciertos aspectos, las composiciones se administran por vía sistémica, particularmente por administración intravascular, que incluye inyección, perfusión y similares. Los métodos pueden comprender adicionalmente administrar una segunda terapia antineoplásica, tal como un segundo virus terapéutico. En aspectos particulares un virus terapéutico puede ser un virus oncolítico, más particularmente un rhabdovirus no VSV. En otros aspectos, un segundo agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico, radioterapéutico, inmunoterapéutico, cirugía o similares.

Otras realizaciones de la invención se analizan durante toda esta solicitud. Cualquier realización analizada con respecto a un aspecto de la invención se aplica a otros aspectos de la invención también, y viceversa.

65 Los términos "inhibir", "reducir" o "prevenir", o cualquier variación de estos términos, cuando se usan en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva incluyen cualquier disminución medible o inhibición completa para

conseguir un resultado deseado. Los resultados deseados incluyen, aunque sin limitación, paliación, reducción, ralentización, o erradicación de una afección cancerosa o hiperproliferativa, así como una calidad mejorada o prolongación de la esperanza de vida.

5 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede indicar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

10 Durante toda esta memoria descriptiva, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación típica del error para el dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor.

15 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" salvo que se indique explícitamente para hacer referencia a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción apoya una definición que se refiere a solamente alternativas y "y/o".

20 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tiene" y "tienen"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" y "incluyen") o "que contiene" (o cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o no limitantes y no excluyen elementos o etapas de método adicionales, no indicadas.

25 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

### Descripción de los dibujos

30 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

35 **FIG. 1.** Relaciones filogenéticas entre rhabdovirus basadas en una alineación GDE de una región relativamente conservada de la proteína N (119 aminoácidos), y usando el paramixovirus virus 1 de parainfluenza humana (HPIV-1) como el grupo de referencia. El árbol se generó por el método de conjuntar los vecinos y los valores de arranque (indicados para cada nudo de ramificación) se estimaron usando 1000 réplicas de árbol. Las longitudes de las ramificaciones son proporcionales a las distancias genéticas. La barra de escala corresponde a sustituciones por sitio de aminoácido (cortesía de H. Badrane y P.J. Walker).

40 **FIG. 2.** Resumen del ensayo de eliminación de células tumorales *in vitro*. Las células del panel celular NCI 60 se infectaron durante 96 horas con una serie de dilución de diversos virus. La viabilidad celular se ensayó usando tinción con violeta cristal para detectar las células viables residuales. El EC<sub>50</sub> se calculó a partir de las curvas resultantes de eliminación celular y se resumieron en formato de tabla. Por motivos de claridad, los valores de EC<sub>50</sub> se han convertido a un valor de 1-7 como se describe en la leyenda. Además, el sombreado se ha usado para indicar el intervalo de EC<sub>50</sub> (es decir, más oscuro a más claro representa los valores mayor de EC<sub>50</sub> a menor de EC<sub>50</sub>). Los virus se abrevian del siguiente modo: MS = Muir Springs, BG = Bahia Grande, NGG = Ngaingan, TIB = Tibrogargan, FMT = Farmington, MRB = Maraba, CRJ = Carajas, VSVHR = Cepa HR del virus de la Estomatitis Vesicular y VV = Virus Vaccinia JX-963. Estos datos demuestran que no todos los rhabdovirus son igualmente oncolíticos, de hecho rhabdovirus estrechamente relacionados se comportan de forma muy diferente en las mismas líneas celulares tumorales. Por tanto, no existe actualmente un método para predecir qué rhabdovirus tienen potencial oncolítico. Es necesario ensayo empírico para identificar buenos virus candidatos oncolíticos.

55 **FIG. 3A-3B.** Productividad de rhabdovirus en líneas celulares tumorales. Se infectaron las líneas celulares de glioblastoma humano SNB19 y carcinoma pulmonar humano NCI H226 con diversos rhabdovirus (MOI=3) y se controlaron en el tiempo para la producción de virus por ensayo de placa. Los datos muestran que no todos los rhabdovirus tienen la misma capacidad de replicarse en estas líneas celulares tumorales. La célula NCI H226 revela una gran disparidad en la productividad de virus con Bahia Grande que no produce virus en absoluto mientras que el virus Maraba es capaz de producir copiosos viriones infecciosos.

60 **FIG. 4.** Esquema del sistema de rescate para recuperar rhabdovirus recombinantes a partir de una forma de ADN plasmídico. En este ejemplo, se ha clonado el virus Maraba en un plásmido de ADN entre el promotor T7 y una secuencia de ribozima del virus de la hepatitis D. Se infectan células A549 con virus vaccinia que expresa T7 y después se transfectan posteriormente con un vector del genoma Maraba modificado por ingeniería para expresar GFP. Los viriones rescatados se purifican y después se usan para infectar células Vero durante 24 horas, provocando una expresión de GFP en estas células cuando se visualizan por microscopía de fluorescencia.

**FIG. 5.** Bioselección de cepas mejoradas de rhabdovirus oncolíticos. Los rhabdovirus son cuasi-especies. Bahía Grande no es neuropatogénico pero tiene la capacidad de eliminar células de glioblastoma humanas. Los inventores contemplaron mejorar su virulencia manteniendo al mismo tiempo su selectividad por células cancerosas. Para mejorar la virulencia de un rhabdovirus para una célula tumoral, los inventores seleccionaron mutantes del virus con capacidad aumentada de replicación en una línea celular de glioblastoma humano. En resumen, se infectaron  $5 \times 10^5$  células SNB19 con  $2,5 \times 10^6$  partículas virales, dando una MOI de 5. El inóculo inicial tenía un volumen de 200  $\mu$ l y se dejó 1 hora para la infección antes de lavar las células 10 veces con PBS. El último lavado se analizó para las partículas virales por ensayo de placa para asegurar una eliminación apropiada del virus introducido. En puntos temporales crecientes, se recogió el sobrenadante completo y se reemplazó con medio fresco. El medio recogido se usó para infectar nuevas células para amplificación y se analizó por ensayo de placa para la presencia de partículas virales. Para el primer pase, las recogidas sucedieron a las 4, 8, 12 y 24 hpi (horas post-infección) hasta que se determinó el tiempo inicial para la liberación viral. Los virus del punto temporal más temprano se amplificaron de nuevo a una población de  $10^6$  y después se volvieron a pasar.

**FIG. 6.** Bioselección de cepas mejoradas de rhabdovirus oncolíticos. En este ejemplo, el virus Bahía Grande experimentó hasta 6 ciclos iterativos de bioselección. La cepa precursora (WT) junto con los pases 4-6 se controlaron para la producción de virus en células SNB19 a las 4, 6 y 8 horas post-infección. Es evidente una mejora clara y progresiva en la velocidad de replicación inicial del virus durante rondas crecientes de bioselección. MTB = Maraba se incluye como ejemplo de replicación rápida y deseable de virus en la línea celular cancerosa.

**FIG. 7.** Bahía Grande P13 experimentó 13 rondas de bioselección. Este virus mostró una replicación mejorada del virus no solamente en el glioblastoma humano usado durante el protocolo de bioselección, sino en un glioblastoma humano no relacionado y una línea celular de carcinoma de ovario humano. Esto demuestra que los rhabdovirus pueden bioseleccionarse para mejorar sus propiedades oncolíticas y estas mejoras son eficaces sobre otros cánceres distintos.

**FIG. 8.** Se infectaron ratones Balb/C de forma intracraneal con los virus indicados un se controlaron para la morbilidad y/o mortalidad. Tanto el VSV de tipo silvestre (cepa HR) como la cepa mutante delta M51 de VSV eran extremadamente neurotóxicas, demostrando parálisis de las extremidades posteriores en días desde la infección, mientras que los virus Bahía Grande y Muir Springs no mostraron neurotoxicidad. Bahía Grande P6 es una cepa bioseleccionada de Bahía Grande con replicación mejorada en células de glioblastoma humano. Esta cepa también mostró ausencia de neurotoxicidad, lo que demuestra que los rhabdovirus pueden bioseleccionarse para virulencia mejorada sobre células tumorales, manteniendo al mismo tiempo su perfil de seguridad en tejido sano normal.

**FIG. 9.** Eficacia *in vivo* de los rhabdovirus Maraba y Carajas en comparación con Chandripura y WT VSV y delta 51 VSV. Se establecieron tumores 4T1 (que expresan luciferasa de luciérnaga) en ratones hembra Balb/C de 5-8 semanas de edad inyectando  $10^6$  células tumorales en la glándula mamaria izquierda posterior. Después de una semana, se inyectó a los ratones por vía intravenosa en el día 1 y 2 (cada dosis =  $10^7$  pfu de WT VSV,  $\Delta$ 51 GFP VSV, Maraba o Chandripura; o  $10^8$  pfu de Carajas). Se midieron las respuestas tumorales por imágenes de bioluminiscencia usando un IVIS 200 (Xenogen) (medido como fotones/s/cm<sup>2</sup>).

**FIG. 10.** Infectividad de VSV sin G pseudotipado con proteína G de Isfahan y proteína G de VSV.

**FIG. 11.** Una curva de crecimiento de una etapa con virus VSV WT, Isfahan y RVR\_IsfG1.

**FIG. 12.** RVR que comprende una proteína G de Isfahan sigue siendo oncolítica. La citotoxicidad de los virus Isfahan, VSV d51 y RVR IsfG1 se evaluaron en diversas líneas celulares cancerosas.

**FIG. 13A-13C.** RVR que comprende Isf G1 es capaz de escapar a la respuesta inmune contra VSV *in vivo*. Se usó detección de luciferasa *in vivo* para determinar la cantidad de virus en ratones inoculados con RVR IsfG1 o VSV. **FIG. 13A**, detección *in vivo* de virus recombinante inyectado en ratones vírgenes. **FIG. 13B**, detección *in vivo* de VSV inyectado en ratones inmunizados con VSV. **FIG. 13C**, detección *in vivo* de virus RVR IsfG1 recombinante inyectado en ratones inmunizados con VSV.

**FIG. 14.** Producciones de virus a partir de tumores infectados. Los tumores se infectaron con virus recombinante VSV en presencia o ausencia de inmunización con VSV (como se indica). Los datos en el gráfico muestran la cantidad de virus resultante de la infección del tumor.

**FIG. 15.** Una curva de crecimiento de una etapa de VSV WT, virus chandripura y RVR<sub>Cha</sub>G<sup>1</sup>. Los resultados muestran que el recombinante produce la misma cantidad de virus que VSV.

**FIG. 16.** Citotoxicidad de VSV WT, virus chandripura y RVR<sub>Cha</sub>G<sup>1</sup>. Los resultados muestran que el recombinante

es tan citotóxico como VSV.

**FIG. 17.** Una curva de crecimiento de una etapa de VSV WT, virus Maraba y RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup>. Los resultados muestran que el título de virus recombinante era mayor que VSV a las 48 y 72 h.

**FIG. 18.** Citotoxicidad de VSV WT, virus Maraba y RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup>. Los resultados muestran que tanto Maraba como RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup> son citotóxicos en líneas celulares tumorales y que generalmente son más citotóxicos para las células tumorales que VSV WT.

## 10 Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la invención se basan en la eliminación por rhabdovirus no VSV o rhabdovirus pseudotipados de varias clases o tipos de células cancerosas, que son resistentes a la eliminación por VSV. Algunas de las ventajas de estos rhabdovirus oncolíticos y rhabdovirus recombinantes incluyen las siguientes: (1) Los anticuerpos contra los rhabdovirus de la invención serán raros a no existentes en la mayoría de poblaciones del mundo. (2) Los rhabdovirus se replican más rápidamente que otros virus oncolíticos tales como adenovirus, reovirus, sarampión, parvovirus, retrovirus, y HSV. (3) Los rhabdovirus crecen a altos títulos y se pueden filtrar a través de un filtro de 0,2 micrómetros. (4) Los rhabdovirus oncolíticos y recombinantes de los mismos tienen un amplio intervalo de hospedador, capaces de infectar muchos tipos diferentes de células cancerosas y no se limitan por los receptores en una célula particular (por ejemplo, coxsackievirus, sarampión, adenovirus). (5) El rhabdovirus de la invención es susceptible a manipulación genética. (6) El rhabdovirus también tiene un ciclo vital citoplasmático y no integra en el material genético de la célula hospedadora, lo que confiere un perfil de seguridad más favorable.

### 25 I. Familia *Rhabdoviridae* (Rhabdovirus)

Los rhabdovirus arquetípicos son el virus de la rabia y de la estomatitis vesicular (VSV), los más estudiados de esta familia de virus. Aunque estos virus comparten morfologías similares, son muy diferentes en su ciclo vital, rango de hospedador, y patología. Los rhabdovirus son una familia de virus con forma de bala que tienen genomas ARN con sentido (-) no segmentados. Existen más de 250 rhabdovirus conocidos que infectan mamíferos, peces, insectos, y plantas. La familia está dividida en al menos 5 géneros: (1) Lyssavirus: incluyendo el virus de la rabia, otros virus de mamífero, algunos virus de insecto; (2) Vesiculovirus: incluyendo el virus de la estomatitis vesicular (VSV); (3) Ephemerovirus: incluyendo el virus de la fiebre efímera bovina (vertebrados); (4) Cytorhabdovirus: incluyendo el virus del amarillamiento necrótico de la lechuga (plantas); y (5) Nucleorhabdovirus: incluyendo el virus de la patata amarilla enana (plantas). También se ha sugerido que existe un supergrupo de rhabdovirus indicado Dimarhabdovirus que incluye diversos rhabdovirus que infectan tanto a mamíferos como a insecto.

La familia *Rhabdovirus* incluye, aunque sin limitación: virus Arajas, virus Chandipura (AF128868 / gi:4583436, AJ810083 / gi:57833891, AY871800 / gi:62861470, AY871799 / gi:62861468, AY871798 / gi:62861466, AY871797 / gi:62861464, AY871796 / gi:62861462, AY871795 / gi:62861460, AY871794 / gi:62861459, AY871793 / gi:62861457, AY871792 / gi:62861455, AY871791 / gi:62861453), virus Cocal (AF045556 / gi:2865658), virus Isfahan (AJ810084 / gi:57834038), virus Maraba (SEC ID N° 1-6), virus Carajas (SEC ID N° 7-12, AY335185 / gi:33578037), virus Piry (D26175 / gi:442480, Z15093 / gi:61405), virus Alagoas de la estomatitis vesicular, virus BeAn 157575, virus Boteke, virus Calchaqui, virus de la anguila americana, virus Gray Lodge, virus Jurona, virus Klamath, virus Kwatta, virus La Joya, virus Malpais Spring, virus del murciélago de Mount Elgon (DQ457103 / gi:91984805), virus Perinet (AY854652 / gi:71842381), virus Tupaia (NC\_007020/ gi:66508427), Farmington, virus Bahia Grande (SEC ID N° 13-18), virus Muir Springs, virus Reed Ranch, virus Hart Park, virus Flanders (AF523199 / gi:25140635, AF523197 / gi:25140634, AF523196 / gi:25140633, AF523195 / gi:25140632, AF523194 / gi:25140631, AH012179 / gi:25140630), virus Kamese, virus Mosqueiro, virus Mossuril, virus Barur, virus Fukuoka (AY854651 / gi:71842379), virus Kern Canyon, virus Nkolbisson, virus Le Dantec (AY854650 / gi:71842377), virus Keuraliba, virus Connecticut, virus New Minto, virus Sawgrass, virus Chaco, virus Sena Madureira, virus Timbo, virus Almpiwar (AY854645 / gi:71842367), virus Aruac, virus Bangoran, virus Bimbo, virus Bivens Arm, virus del cangrejo azul, virus Charleville, virus de la planicie costera, virus DakArk 7292, virus Entamoeba, virus Garba, virus Gossas, virus Humpty Doo (AY854643 / gi:71842363), virus Joinjakaka, virus Kannamangalam, virus Kolongo (DQ457100 / gi:91984799 ARNm de nucleoproteína (N), cds parcial); virus Koolpinyah, virus Kotonkon (DQ457099 / gi:91984797, AY854638 / gi:71842354); virus Landjia, virus Manitoba, virus Marco, virus Nasoule, virus Navarro, virus Ngaingan (AY854649 / gi:71842375), virus Oak-Vale (AY854670 / gi:71842417), virus Obodhiang (DQ457098 / gi:91984795), virus Oita (AB116386 / gi:46020027), virus Ouango, virus Parry Creek (AY854647 / gi:71842371), virus de los cíclidos de Rio Grande, virus Sandjimba (DQ457102 / gi:91984803), virus Sigma (AH004209 / gi:1680545, AH004208 / gi:1680544, AH004206 / gi:1680542), virus Sripur, virus Sweetwater Branch, virus Tibrogargan (AY854646 / gi:71842369), virus Xiburema, virus Yata, Rhode Island, virus del Rio Adelaide (U10363 / gi:600151, AF234998 / gi:10443747, AF234534 / gi:9971785, AY854635 / gi:71842348), virus Berrimah (AY854636 / gi:71842350)), virus Kimberley (AY854637 / gi:71842352), o virus de la fiebre efímera bovina (NC\_002526 / gi:10086561).

65 Ciertos serotipos no asignados incluyen (1) grupo Bahia Grande (virus Bahia Grande (BGV), virus Muir Springs (MSV), virus Reed Ranch (RRV); (2) grupo Hart Park (virus Flanders (FLAV), virus Hart Park (HPV), virus Kamese

(KAMV), virus Mosqueiro (MQOV), virus Mossuril (MOSV); (3) grupo Kern Canyon (virus Barur (BARV), virus Fukuoka (FUKAV), virus Kern Canyon (KCV), virus Nkolbisson (NKOV)); (4) grupo Le Dantec (virus Le Dantec (LDV), virus Keuraliba (KEUV), (5) grupo Sawgrass (virus Connecticut (CNTV), virus New Minto (NMV), virus Sawgrass (SAWV)); (6) grupo Timbo (virus Chaco (CHOV), virus Sena Madureira (SMV), virus Timbo (TIMV)); y (7) otros virus no asignados (virus Alpiwar (ALMV), virus Aruac (ARUV), virus Bangoran (BGNV), virus Bimbo (BBOV), virus Bivens Arm (BAV), virus del cangrejo azul (BCV), virus Charleville (CHVV), virus de las planicies costeras (CPV), virus DakArK 7292 (DAKV-7292), virus Entamoeba (ENTV), virus Garba (GARV), virus Gossas (GOSV), virus Humpty Doo (HDOOV), virus Joinjakaka (JOIV), virus Kannamangalam (KANV), virus Kolongo (KOLV), virus Koolpinyah (KOOLV), virus Kotonkon (KOTV), virus Landjia (LJAV), virus Manitoba (MNTBV), virus Marco (MCOV), Ngaingan, virus Nasoule (NASV), virus Navarro (NAW), virus Ngaingan (NGAV), virus Oak-Vale (OVRV), virus Obodhiang (OBOV), virus Oita (OITAV), virus Ouango (OUAV), virus Parry Creek (PCRV), virus de los ciclidos de Rio Grande (RGRCV), virus Sandjimba (SJAV), virus Sigma [X91062] (SIGMAV), virus Sripur (SRIV), virus Sweetwater Branch (SWBV), virus Tibrogargan (TIBV), virus Xiburema (XIBV), virus Yata (YATAV).

15 Aspectos de la invención pueden incluir, aunque sin limitación, la selección de rhabdovirus no VSV o rhabdovirus pseudotipados basada en su crecimiento en líneas celulares de mamífero, la ausencia de o toxicidad mínima en ratones adultos (animales), la ausencia de o toxicidad mínima en ratones lactantes (animales).

**A. Genoma rhabdoviral**

20 Normalmente el genoma de rhabdovirus es de aproximadamente 11 - 15kb con un líder 3' de aproximadamente 50 nucleótidos y una región 5' no traducida de aproximadamente 60 nucleótidos de un ARN viral con sentido (-) (ARNv). Normalmente, el ARNv de rhabdovirus tiene 5 genes que codifican 5 proteínas. Los rhabdovirus tienen una señal de poliadenilación conservada al final de cada gen y una corta región intergénica entre cada uno de los 5 genes. Todos los rhabdovirus contienen 5 genes que codifican la proteína de nucleocápsida (N), fosfoproteína (P, también denominada NS), proteína de matriz (M), glucoproteína (G), y proteína grande (L). Normalmente estos genes están ordenados en el ARNv de sentido negativo de siguiente modo: 3'-N-P-M-G-(X)-L-5'. El orden de los genes es importante ya que dictamina la proporción de proteínas sintetizadas. Cualquier manipulación de un genoma de rhabdovirus normalmente incluirá al menos 5 dominios de transcripción para mantener la capacidad de infectar y replicarse a altos niveles. Los rhabdovirus tienen ARN polimerasa endógena para la transcripción del ARN mensajero con sentido más (ARNm). El gen X no existe en todos los rhabdovirus. El gen X codifica una proteína no estructural encontrada en el primer virus infeccioso de necrosis hematopoyética (GenBank DQ164103 / gij76262981; DQ164102 / gij76262979; DQ164101 / gij76262977; DQ164100 / gij76262975; DQ164099 / gij76262973; AB250935 / gij112821165; AB250934 / gij112821163; AB250933 / gij112821161; AB250932 / gij112821159; AB250931 / gij112821157; AB250930 / gij112821155; AB250929 / gij112821153; AB250928 / gij112821151; AB250927 / gij112821149, que describen la secuencia de nucleótidos de transcripción que codifica la proteína G), una glucoproteína no estructural en el virus de la fiebre efímera bovina y un pseudogen en el virus de la rabia. El gen extra (X) se ha encontrado en diferentes localizaciones en el genoma de rhabdovirus. La síntesis de la proteína M en células infectadas es citopática a la célula, y finalmente provocará muerte celular.

40 La transmisión de rhabdovirus varía dependiendo del virus/hospedador, pero la mayoría se transmiten por contacto directo - por ejemplo, transmisión de la rabia por mordedura de animal o vector de insecto. Existe un largo periodo de incubación *in vivo*, pero esto no se refleja en la cinética de la replicación del virus en cultivo. Las espinas de proteína G se unen a receptores en la superficie de células hospedadoras y los virus entran en la célula por endocitosis y fusión con la membrana de la vesícula, mediada por la proteína G.

Sin intención de limitarse a ninguna teoría particular, las moléculas receptoras para rhabdovirus se cree que son fosfolípidos en lugar de proteínas específicas. La replicación rhabdoviral sucede en el citoplasma - ambas proteínas tanto L y NS son necesarias para transcripción - ni funcionan solas. Se producen cinco ARNm monocistrónicos, con un capuchón en el extremo 5' y poliadenilados en el extremo 3' y cada uno contiene la secuencia líder desde el extremo 3' del ARNv en el extremo 5' del mensaje. Estos ARNm se elaboran por transcripción secuencial de las ORF en el genoma del virus y se ha demostrado que la secuencia intergénica es responsable de la terminación y reinicio de la transcripción por la polimerasa entre cada gen, produciendo de este modo transcritos diferentes.

55 El ARNv descendiente se elabora a partir de un intermedio con sentido (+). El genoma se replica por el complejo de polimerasa L + P (como en la transcripción), pero también son necesarios factores adicionales de la célula hospedadora. Es característico de los rhabdovirus que estos eventos sucedan todos en una parte del citoplasma que actúa como una "fábrica" de virus y aparece como un cuerpo de inclusión citoplasmático característico.

**B. Variantes de proteínas virales**

60 En ciertas realizaciones, un rhabdovirus o un rhabdovirus no VSV comprenderá una variante de una o más de las proteínas N, P, M, G, y/o L como se ha definido anteriormente. En ciertos aspectos de la invención estas variantes de proteínas virales pueden estar comprendidas en una composición proteica, que se define adicionalmente a continuación. Las composiciones proteicas incluyen partículas virales y otras composiciones que tienen uno o más componentes proteicos virales. Estas variantes polipeptídicas pueden modificarse por ingeniería o seleccionarse

para una modificación en una o más características fisiológicas o biológicas, tales como rango de célula hospedadora, especificidad de célula hospedadora, toxicidad a células u organismos no diana, replicación, citotoxicidad a una célula diana, eliminación de células cancerosas, estasis de células cancerosas, infectividad, parámetros de fabricación, tamaño de partícula viral, estabilidad de partículas virales, eliminación *in vivo*,  
 5 inmunorreactividad, y similares. Estas variantes polipeptídicas pueden modificarse por ingeniería usando diversas metodologías conocidas en la técnica, incluyendo diversas técnicas de mutagénesis descritas, véase a continuación.

### C. Rhabdovirus recombinantes

10 El rhabdovirus recombinante puede producirse (1) completamente usando ADNc o (2) una combinación de ADNc transfectado en una célula hospedadora, o (3) ADNc transfectado en una célula, que se infecta adicionalmente con un minivirus que proporciona en trans los componentes o actividades restantes necesarios para producir un rhabdovirus recombinante infeccioso o no infeccioso. Usando cualquiera de estos métodos (por ejemplo, minivirus, línea celular auxiliar, o transfección con ADNc solamente), los componentes mínimos requeridos son una molécula  
 15 de ARN que contiene las señales de acción en cis para (1) la encapsidación del ARN genómico (o antígenómico) por la proteína N de Rhabdovirus, y (2) la replicación de un ARN genómico o antígenómico (intermedio replicativo) equivalente.

20 Mediante un elemento de replicación o replicón, los inventores indican una hebra de ARN que contiene mínimamente en los extremos 5' y 3' la secuencia líder y la secuencia tráiler de un rhabdovirus. En el sentido genómico, el líder está en el extremo 3' y el tráiler está en el extremo 5'. Cualquier ARN colocado entre estas dos señales de replicación se replicará a su vez. Las regiones líder y tráiler deben contener adicionalmente los elementos de acción en cis mínimos para propósitos de encapsidación por la proteína N y para la unión de la polimerasa que son necesarios para iniciar la transcripción y la replicación.

25 Para preparar rhabdovirus modificados por ingeniería, un minivirus que contenga el gen G también contendría una región líder, una región tráiler y un gen G con las señales apropiadas de inicio y terminación para producir un ARNm de proteína G. Si el minivirus comprende adicionalmente un gen M, las señales apropiadas de inicio y terminación para producir el ARNm de la proteína M también deben estar presentes.

30 Para cualquier gen contenido dentro del genoma de rhabdovirus modificado por ingeniería, el gen estaría flanqueado por las señales apropiadas de inicio y terminación de la transcripción que permitirán la expresión de esos genes y la producción de los productos proteicos. Particularmente, un gen heterólogo, que es un gen que normalmente no está codificado por un rhabdovirus aislado de la naturaleza o contiene una región codificante de rhabdovirus en una  
 35 posición, forma o contexto en que se encuentra normalmente, por ejemplo, una proteína G quimérica.

40 Para producir rhabdovirus modificado por ingeniería "no infeccioso", el rhabdovirus modificado por ingeniería debe de tener los elementos mínimos de replicón y las proteínas N, P, y L y debe contener el gen M (un ejemplo es la construcción  $\Delta G$  o sin G, que ha perdido la región codificante para la proteína G). Esto produce partículas virales que se geman desde la célula, pero son partículas no infecciosas. Para producir partículas "infecciosas", las partículas virales deben comprender adicionalmente proteínas que puedan mediar la unión y fusión de la partícula viral, tal como a través del uso de una proteína de unión o ligando de receptor. El ligando de receptor nativo de rhabdovirus es la proteína G.

45 Una "célula adecuada" o "célula hospedadora" significa cualquier célula que permitiría el ensamblaje del rhabdovirus recombinante.

50 Para preparar partículas virales infecciosas, primero se infecta una línea celular apropiada (por ejemplo, células BHK) con virus vaccinia vTF7-3 (Fuerst *et al.*, 1986) o equivalente que codifica un ARN polimerasa T7 u otra polimerasa adecuada de bacteriófago tal como las polimerasas T3 o SP6 (véase Usdin *et al.*, 1993 o Rodríguez *et al.*, 1990). Las células después se transfectan con ADNc individuales que contienen los genes que codifican las proteínas de rhabdovirus G, N, P, L y M. Estos ADNc proporcionarán las proteínas para construir una partícula de rhabdovirus recombinante. Las células pueden transfectarse por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, liposomas, electroporación, etc.).

55 También se transfecta en la línea celular un "ADNc policistrónico" que contiene el ARN genómico de rhabdovirus equivalente. Si se pretende que la partícula de rhabdovirus recombinante infeccioso sea lítica en una célula infectada, entonces los genes que codifican las proteínas N, P, M y L deben estar presentes así como cualquier segmento de ácido nucleico heterólogo. Si no se pretende que la partícula de rhabdovirus recombinante infecciosa sea lítica, entonces el gen que codifica la proteína M no se incluye en el ADN policistrónico. Por "ADNc policistrónico" se entiende un ADNc que comprende al menos unidades de transcripción que contiene los genes que codifican las proteínas N, P y L. El ADN policistrónico de rhabdovirus recombinante también puede contener un gen que codifica una proteína variante o fragmento polipeptídico de la misma, o un ácido nucleico terapéutico. Como alternativa, puede suministrarse in trans cualquier proteína a asociar inicialmente con la partícula viral producida  
 60 primero o fragmento de la misma.  
 65

Otra realización contemplada es un ADNc policistrónico que comprende un gen que codifica una proteína indicadora o proteína fluorescente (por ejemplo, proteína fluorescente verde y sus derivados,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, etc.), los genes N-P-L o N-P-L-M, y/o una proteína de fusión o un ácido nucleico terapéutico. Otro ADN policistrónico contemplado puede contener un gen que codifica una variante proteica, un gen que codifica un indicador, un ácido nucleico terapéutico, y/o cualquiera de los genes N-P-L o los genes N-P-L-M.

La primera etapa en la generación de un rhabdovirus recombinante es la expresión de un ARN que es un equivalente genómico o antígenómico de un ADNc. Después ese ARN se empaqueta por la proteína N u después se replica por las proteínas P/L. El virus así producido puede recuperarse. Si la proteína G está ausente del genoma del ARN recombinante, entonces normalmente se suministra en trans. Si ambas proteínas G y M están ausentes, entonces ambas se suministran en trans.

Para preparar partículas "de rhabdovirus no infeccioso", el procedimiento puede ser el mismo que el anterior, excepto que el ADNc policistrónico transfectado en las células contendría los genes N, P y L del rhabdovirus solamente. El ADNc policistrónico de partículas de rhabdovirus no infecciosas puede contener adicionalmente un gen que codifica una proteína indicadora o un ácido nucleico terapéutico. Para una descripción adicional respecto a los métodos para producir un rhabdovirus recombinante que carezca del gen que codifica la proteína G, véase Takada *et al.* (1997).

### 1. Cultivo de células para producir virus

Las células transfectadas habitualmente se incuban durante al menos 24 horas a la temperatura deseada, habitualmente aproximadamente 37°C. Para partículas virales no infecciosas, el sobrenadante se recoge y se aíslan las partículas virales. Para partículas virales infecciosas, el sobrenadante que contiene el virus se recoge y se transfiere a células frescas. Las células frescas se incuban durante aproximadamente 48 horas, y se recoge el sobrenadante.

### 2. Purificación del Rhabdovirus recombinante

Los términos "aislamiento" o "aislar" un Rhabdovirus significa el proceso de cultivar y purificar las partículas virales de modo que permanezca muy poco desecho celular. Un ejemplo sería recoger el sobrenadante que contiene virión y pasarlo a través de un filtro de tamaño de poro de 0,1-0,2 micrómetros (por ejemplo, Millex-GS, Millipore) para retirar el virus y los desechos celulares. Como alternativa, los viriones pueden purificarse usando un gradiente, tal como un gradiente de sacarosa. Después las partículas de rhabdovirus recombinante pueden sedimentarse y resuspenderse en cualquier excipiente o vehículo que se desee. Los títulos pueden determinarse por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos específicos para proteínas particulares.

### 3. Métodos para preparar Rhabdovirus recombinantes usando ADNc y un minivirus o una línea celular auxiliar

Tanto los "minivirus" como las "células auxiliares" (también conocidas como "líneas celulares auxiliares") proporcionan la misma cosa: proporcionar una fuente de proteínas de rhabdovirus para el ensamblaje de viriones de rhabdovirus. Un ejemplo de un minivirus de rhabdovirus es el minivirus VSV que expresa solamente la proteína G y M, como se indica por Stillman *et al.*, (1995). Los virus auxiliares y minivirus se usan como métodos para proporcionar proteínas de rhabdovirus que no se producen a partir del ADNc transfectado que codifica los genes para proteínas de rhabdovirus.

Cuando se usa un minivirus, las células se infectan con virus vaccinia como se ha descrito anteriormente con el fin de proporcionar ARN polimerasa T7. El ARN policistrónico deseado, y los plásmidos que contienen los genes N, P y L se transfectan en las células. La mezcla de transfección se retira después de aproximadamente 3 horas, las células se infectan con el minivirus a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de aproximadamente 1. El minivirus suministra las proteínas G y/o M perdidas. El ARN policistrónico transfectado en la célula dependerá de si se quiere un rhabdovirus recombinante infeccioso o no infeccioso.

Como alternativa, podría usarse un minivirus para proporcionar los genes N, P, y L. El minivirus también podría usarse para producir la proteína M además de N, P, y L. El minivirus también puede producir la proteína G.

Cuando se usa una línea celular auxiliar, los genes que codifican las proteínas perdidas de rhabdovirus se producen por la línea celular auxiliar. La línea celular auxiliar tiene proteínas N, P, L, y G para la producción de partículas de rhabdovirus recombinante que no codifica proteína G de tipo silvestre. Las proteínas se expresan a partir de genes o ADN que no son parte del genoma viral recombinante. Estos plásmidos u otro sistema de vector se incorporan de forma estable en el genoma de la línea celular. Las proteínas después se producen a partir del genoma de la célula y no a partir de un replicón en el citoplasma. La línea celular auxiliar después puede transfectarse con un ADN policistrónico y ADNc plasmídicos que contienen los otros genes de rhabdovirus no expresados por el virus auxiliar. El ARN policistrónico usado dependerá de si se desea un rhabdovirus recombinante infeccioso o no infeccioso. Por

lo demás, el suministro de los productos génicos perdidos (por ejemplo, G y/o M) se conseguiría como se ha descrito anteriormente.

## II. Composiciones virales

5 La presente invención se refiere a rhabdovirus que son ventajosos en el estudio y tratamiento de células hiperproliferativas o neoplásicas (por ejemplo, células cancerosas) y afecciones hiperproliferativas o neoplásicas (por ejemplo, cáncer) en un paciente. Puede referirse, aunque sin limitación, a rhabdovirus con una neurovirulencia reducida, por ejemplo, rhabdovirus no VSV. En ciertos aspectos el rhabdovirus que codifica o contienen uno o más componentes proteicos (proteínas N, P, M, G, y/o L) o un genoma de ácido nucleico distinto de los de VSV (es decir, al menos o como mucho 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 % idéntico a nivel de aminoácidos o nucleótidos), y/o que se ha construido con una o más mutaciones o variaciones en comparación con un virus o proteínas virales de tipo silvestre de modo que el virus tenga propiedades deseables para uso contra células cancerosas, siendo al mismo tiempo menos tóxico o no tóxico para células no cancerosas que el virus aislado originalmente o VSV. Los contenidos descritos a continuación proporcionan diversos ejemplos de protocolos para implementar métodos y composiciones de la invención. Proporcionan antecedentes para generar virus mutados o variantes a través del uso de bioselección o tecnología de ADN o ácido nucleico recombinante.

### A. Composiciones proteicas

20 Las composiciones proteicas incluyen partículas virales y composiciones que incluyen las partículas virales, así como polipéptidos aislados. En ciertos aspectos, se generan o aíslan rhabdovirus oncolíticos pseudotipados o no VSV (rhabdovirus que lisan, eliminan, o retardan el crecimiento de células cancerosas). En ciertas realizaciones, los rhabdovirus se modificarán por ingeniería para incluir variantes polipeptídicas de proteínas de rhabdovirus (N, P, M, G, y/o L) y/o ácidos nucleicos terapéuticos que codifican polipéptidos terapéuticos. Otros aspectos incluyen el aislamiento de rhabdovirus que carecen de uno o más polipéptidos o proteínas funcionales. En otras realizaciones, la presente invención se refiere a rhabdovirus y se usa en combinación con o incluidos dentro de composiciones proteicas como parte de una formulación farmacéuticamente aceptable.

30 Como se usa en este documento, una "proteína" o "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de restos de aminoácido. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, todo o una parte de una proteína viral o polipéptido está ausente o alterada de modo que vuelve al virus más útil para el tratamiento de un paciente. Los términos descritos anteriormente pueden usarse de forma intercambiable en este documento. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" o "proteína variante" o "polipéptido variante" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química o secuencia de aminoácidos está alterada con respecto a la proteína o polipéptido de tipo silvestre o de referencia. En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido modificado tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). La actividad o función modificada puede estar reducida, disminuida, eliminada, potenciada, mejorada, o alterada de algún otro modo (tal como especificidad de infección) con respecto a esa actividad o función en una proteína o polipéptido de tipo silvestre, o las características del virus que contiene dicho polipéptido. Se contempla que una proteína o polipéptido modificado puede alterarse con respecto a una actividad o función reteniendo aún la actividad o función de tipo silvestre o inalterada en otros aspectos. Como alternativa, una proteína modificada puede ser completamente no funcional o su secuencia de ácido nucleico afín puede haberse alterado de modo que el polipéptido ya no se exprese en absoluto, esté truncado, o exprese una secuencia diferente de aminoácidos como resultado de un desplazamiento de fase u otra modificación.

50 En ciertas realizaciones, el tamaño de una proteína o polipéptido recombinante puede comprender, aunque sin limitación, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 o más restos de moléculas de aminoácido, y cualquier intervalo derivable en el mismo. Se contempla que los polipéptidos pueden modificarse por truncamiento, volviéndolos más cortos que su forma correspondiente inalterada o por fusión o reordenamiento de dominios que puede volver a la proteína alterada más larga.

60 Como se usa en este documento, una "molécula amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido, o mimético de aminoácido que sería conocida para un especialista en la técnica. En ciertas realizaciones, los restos de la molécula proteica son secuenciales, sin ninguna molécula no amino que interrumpa la secuencia de restos de moléculas amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de moléculas no amino. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la molécula proteica puede estar interrumpida por uno o más restos de moléculas no amino. Por consiguiente, la expresión "composición proteica" abarca secuencias de moléculas amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas de forma natural, o al menos un aminoácido modificado o inusual.

Las composiciones proteicas pueden prepararse por cualquier técnica conocida para los especialistas en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos, o péptidos a través de técnicas convencionales de biología molecular, el aislamiento de compuestos proteicos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de materiales proteicos. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos para diversos genes o genomas de rhabdovirus se han descrito previamente, y pueden encontrarse en bases de datos computarizadas conocidas para los especialistas en la técnica. Una de dichas bases de datos es la base de datos GenBank y GenPept del National Center for Biotechnology Information's, a las que puede accederse mediante internet en el [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes para estos genes y virus conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas descritas en este documento o serían conocidas para los especialistas en la técnica.

### B. Aspectos funcionales

Cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de proteínas o polipéptidos virales, se entiende que hace referencia a la actividad o función de esa proteína o polipéptido viral en condiciones fisiológicas, salvo que se especifique de otro modo. Por ejemplo, la proteína G está implicada en la especificidad y eficacia de unión e infección de tipos celulares particulares. La determinación de cuales de las moléculas poseen esta actividad puede conseguirse usando ensayos familiares para los especialistas en la técnica, tales como ensayos de infectividad, ensayos de unión a proteína, ensayos de placa y similares.

### C. Variantes de polipéptidos virales

Las variantes de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la presente descripción pueden ser variantes de sustitución, inserción o delección. Una mutación en un gen que codifica un polipéptido viral puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más aminoácidos no contiguos o contiguos (es decir, segmento) de un polipéptido, en comparación con un polipéptido de tipo silvestre o no alterado u otro polipéptido de referencia. Diversos polipéptidos codificados por rhabdovirus pueden identificarse por referencia a los números de acceso a GenBank y las entradas relacionadas en base de datos públicas para cada uno de los virus descritos en este documento.

Las variantes de delección carecen de uno o más restos de la proteína nativa, inalterada o de tipo silvestre. Pueden deleccionarse restos individuales, o puede deleccionarse todo o parte de un dominio (tal como un dominio catalítico o de unión). Puede introducirse un codón de parada (por sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción normalmente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido, un tipo específico de inserto es un polipéptido quimérico que incluye partes homólogas o similares de una proteína relacionada en lugar de la parte relacionada de una proteína diana. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente uno o más restos. También pueden generarse adiciones terminales, normalmente llamadas proteínas de fusión.

Las variantes de sustitución normalmente contienen el intercambio de uno aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservativas, es decir, se reemplaza un aminoácido con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Como alternativa, las sustituciones pueden ser no conservativas de modo que se vea afectada una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservativos normalmente implican sustituir un resto con uno que sea químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

La expresión "codón funcionalmente equivalente" se usa en este documento para hacer referencia a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la Tabla 1, a continuación).

Tabla 1. Tabla de codones

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG

Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACA
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos adicionales N- o C-terminales o secuencias 5' o 3', y ser todavía esencialmente como se expone en este documento, incluyendo tener una cierta actividad biológica. La adición de secuencias terminales particularmente se aplica a secuencias de ácido nucleico que pueden incluir, por ejemplo, diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las partes 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que existen dentro de los genes.

Lo siguiente es un análisis basado en el cambio de los aminoácidos de una proteína N, P, L, o G para crear una molécula equivalente, o incluso mejorada. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión sobre moléculas de sustrato. Como es la capacidad y naturaleza interactiva de una proteína lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica, y en su secuencia codificante de ADN subyacente, y no obstante producir una proteína con propiedades similares. Por tanto se contempla por los inventores que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de ADN del rhabdovirus sin pérdida apreciable de la utilidad o actividad biológica de interés, como se analiza a continuación.

En la elaboración de dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica a una proteína está comprendido en líneas generales en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo de un aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse de forma eficaz basada en la hidrofiliidad. La patente de Estados Unidos 4.554.101, establece que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor similar de hidrofiliidad y aún produce una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ±2, son particularmente preferidos aquellos que están dentro de ±1, y son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de ±0,5.

Como se ha resumido anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones ejemplares que toman en consideración las diversas características anteriores son bien conocidas para los especialistas en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

### III. Moléculas de ácido nucleico

La presente invención incluye polinucleótidos que pueden aislarse de células que son capaces de expresar todo o parte de una proteína o polipéptido viral. En algunas realizaciones de la invención, afecta a todo o partes de un genoma viral que se ha mutado o alterado específicamente para generar un virus o polipéptido viral, por ejemplo, un polipéptido rhabdoviral o virus pseudotipado o no VSV, con ciertas propiedades y/o características. Los

polinucleótidos pueden codificar un péptido o polipéptido que contenga todo o parte de una secuencia de aminoácidos viral o heteróloga o se haya modificada por ingeniería de modo que no codifique dicho polipéptido viral o codifique un polipéptido viral que tenga al menos una función o actividad añadida, aumentada, reducida, añadida, disminuida, o ausente. Las proteínas recombinantes pueden purificarse de las células de expresión para producir proteínas activas. El genoma de miembros de rhabdovirus puede encontrarse en los números de acceso a GenBank en la base de datos del NCBI o bases de datos similares.

#### A. Polinucleótidos que codifican proteínas nativas o modificadas

Como se usa en este documento, la expresión "segmento de ARN, ADN, o ácido nucleico" se refiere a una molécula de ARN, ADN, o ácido nucleico que se ha aislado libre de ADN genómico total u otros contaminantes. Por lo tanto, un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ácido nucleico que contiene secuencias de tipo silvestre, polimórficas, o mutantes codificantes de polipéptido pero que están aisladas de, o purificadas libres de, uno o más ácidos nucleicos genómicos. Se incluyen dentro de la expresión "segmento de ácido nucleico" polinucleótidos, segmentos de ácido nucleico más pequeños que un polinucleótido, y vectores recombinantes incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

Como se usa en esta solicitud, la expresión "polinucleótido de rhabdovirus" puede referirse a una molécula de ácido nucleico rhabdoviral pseudotipada o no VSV que codifica al menos un polipéptido de rhabdovirus no VSV. En ciertas realizaciones, el polinucleótido se ha aislado libre de otros ácidos nucleicos. Asimismo, un "polinucleótido de virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs y/o virus Bahia Grande" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs y/o virus Bahia Grande que se ha aislado de otros ácidos nucleicos. Un "genoma de rhabdovirus" o un "genoma de virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs y/o virus Bahia Grande" se refiere a una molécula de ácido nucleico VSV o no VSV que pueden proporcionarse a una célula hospedadora para producir una partícula viral, en presencia o ausencia de un virus auxiliar o regiones codificantes complementarias que suministran otros factores en trans. El genoma puede haberse mutado de forma recombinante o no en comparación con un virus de tipo silvestre o no alterado.

El término "ADNc" pretende hacer referencia a un ADN preparado usando ARN como molde. Puede haber ocasiones en que se prefiere la secuencia genómica completa o parcial.

También se contempla que un polipéptido particular de una especie dada puede estar representado por variantes naturales que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes pero, a pesar de ello, codifican la misma proteína (véase la Tabla 1 anterior).

Asimismo, un polinucleótido que codifica un polipéptido aislado o purificado de tipo silvestre o modificado se refiere a un segmento de ADN que incluye secuencias que codifican polipéptido de tipo silvestre o mutante y, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, sustancialmente aisladas de otros genes de origen natural o secuencias codificantes de proteína. A este respecto, el término "gen" se usa por simplicidad para hacer referencia a una unidad de ácido nucleico que codifica una proteína, polipéptido, o péptido (incluyendo cualquier secuencia necesaria para la apropiada transcripción, modificación post-traducciona, o localización). Como entenderán los especialistas en la técnica, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc, y segmentos más pequeños de ácido nucleico modificados por ingeniería que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido nativo o modificado puede contener un ácido nucleico contiguo de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, o más nucleótidos, nucleósidos, o pares de bases.

En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos aislados de ácido nucleico y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos de rhabdovirus de tipo silvestre o mutantes que incluyen dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contiguos de acuerdo con, o esencialmente correspondiente a un polipéptido nativo como se define por las reivindicaciones. El término "recombinante" puede usarse junto con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico, y éste se refiere en líneas generales a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que se ha manipulado *in vitro* o que es el producto replicado de dicha molécula.

En otras realizaciones, la invención se refiere a segmentos aislados de ácido nucleico y vectores recombinantes que incorporan secuencias nucleicas que codifican un polipéptido o péptido como se define en las reivindicaciones que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contiguos de acuerdo con, o esencialmente correspondiente a uno o más polipéptidos de rhabdovirus.

Los segmentos de ácido nucleico usados en la presente invención como se define por las reivindicaciones,

independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios adicionales de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de modo que su longitud global puede variar considerablemente. Por lo tanto se contempla que puede emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada la longitud total preferiblemente por la facilidad de preparación y uso en el protocolo pretendido de ácido nucleico recombinante.

Se contempla que las construcciones de ácido nucleico de la presente invención que se definen por las reivindicaciones pueden codificar uno o más polipéptidos de longitud completa de cualquier fuente o codificar una versión truncada o modificada del o los polipéptidos, por ejemplo un polipéptido truncado de rhabdovirus, de modo que el transcrito de la región codificante representa la versión truncada. El transcrito truncado después puede traducirse en una proteína truncada. Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia polipeptídica de longitud completa con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo para permitir la purificación del polipéptido, su transporte, secreción, modificación post-traducciona, o para beneficios terapéuticos tales como direccionamiento o eficacia. Como se ha analizado anteriormente, puede añadirse una marca u otro polipéptido heterólogo a la secuencia que codifica el polipéptido modificado, donde "heterólogo" se refiere a un polipéptido o segmento del mismo que no es igual que el polipéptido modificado o se encuentra asociado con o codificado por el virus de origen natural.

En un ejemplo no limitante, puede prepararse una o más construcciones de ácido nucleico que incluyan un tramo contiguo de nucleótidos idéntico a o complementario a un segmento viral particular, tal como un gen N, P, M, G, o L de rhabdovirus como se define por las reivindicaciones. Una construcción de ácido nucleico puede ser de al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 50.000, 100.000, 250.000, 500.000, 750.000, hasta al menos 1.000.000 nucleótidos de longitud, así como construcciones de mayor tamaño, hasta e incluyendo tamaños cromosómicos (incluyendo todas las longitudes intermedias e intervalos intermedios). Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias" e "intervalos intermedios", como se usan en este documento, significan cualquier longitud o intervalos incluyendo o entre los valores citados (es decir, todos los números enteros incluyendo y entre dichos valores).

Los segmentos de ácido nucleico usados en la presente invención abarcan ácidos nucleicos modificados como se define por las reivindicaciones que codifican polipéptidos modificados. Dichas secuencias pueden surgir como una consecuencia de redundancia de codones y equivalencia funcional que se sabe que sucede de forma natural dentro de las secuencias de ácido nucleico y las proteínas así codificadas. Como alternativa, pueden crearse proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en que pueden diseñarse por ingeniería cambios en la estructura proteica, basada en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se están intercambiando. Los cambios diseñados por el ser humano pueden introducirse a través de la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras a la antigenicidad o ausencia de la misma de la proteína, para reducir los efectos de toxicidad de la proteína *in vivo* para un sujeto al que se ha dado la proteína, o para aumentar la eficacia de cualquier tratamiento que implique la proteína o un virus que comprenda dicha proteína.

En otras ciertas realizaciones, la invención se refiere a segmentos aislados de ácido nucleico y vectores recombinantes que incluyen dentro de su secuencia una secuencia contigua de ácido nucleico desde la mostrada en secuencias identificadas en este documento, es decir, como se define por las reivindicaciones. Dichas secuencias, sin embargo, puede mutarse para producir un producto proteico cuya actividad esté alterada con respecto al tipo silvestre.

También se entenderá que esta descripción no se limita a las secuencias particulares de ácido nucleico y aminoácidos de estas secuencias identificadas. Por lo tanto los vectores recombinantes y segmentos aislados de ácido nucleico pueden incluir diversamente regiones codificantes de rhabdovirus en sí mismas, regiones codificantes que albergan alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región codificante básica, o pueden codificar polipéptidos más grandes que no obstante incluyen regiones codificantes de rhabdovirus, o pueden codificar proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales que tienen secuencias variantes de aminoácidos.

Los segmentos de ácido nucleico de la presente invención se definen por las reivindicaciones y pueden codificar proteínas o péptidos de rhabdovirus que son el equivalente funcional biológico de, o variantes o mutantes de rhabdovirus que aumentan el beneficio terapéutico del virus. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia de codones y equivalencia funcional que se sabe que sucede de forma natural dentro de las secuencias de ácido nucleico y las proteínas así codificadas. Como alternativa, pueden crearse proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en que pueden diseñarse por ingeniería cambios en la estructura proteica, basada en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se están intercambiando. Los cambios diseñados por el hombre pueden introducirse a través de la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la unión a células cancerosas de una proteína viral.

## B. Mutagénesis de polinucleótidos de rhabdovirus

En diversas realizaciones, el polinucleótido de rhabdovirus definido por las reivindicaciones puede alterarse o mutagenizarse. Las alteraciones o mutaciones pueden incluir inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, inversiones, y similares y puede provocar la modulación, activación y/o inactivación de ciertas proteínas o mecanismos moleculares, así como la alteración de la función, localización, o expresión de un producto génico, en particular las que vuelven a un producto génico no funcional. Cuando se emplea, la mutagénesis de un polinucleótido que codifica todo o parte de un rhabdovirus puede conseguirse por diversos procedimientos mutagénicos convencionales (Sambrook *et al.*, 2001). La mutación es el proceso por el cual suceden cambios en la cantidad o estructura de un organismo. La mutación puede implicar modificación de la secuencia de nucleótidos de un único gen, bloques de genes o genomas completos. Los cambios en genes individuales pueden ser la consecuencia de mutaciones puntuales que implican la eliminación, adición o sustitución de una única base nucleotídica dentro de una secuencia de ADN, o pueden ser la consecuencia de cambios que implican la inserción o deleción de grandes cantidades de nucleótidos.

### 1. Mutagénesis aleatoria

#### a. Mutagénesis de inserción

La mutagénesis de inserción se basa en la inactivación de un gen mediante inserción de un fragmento conocido de ácido nucleico. Como implica la inserción de algún tipo de fragmento de ácido nucleico, las mutaciones generadas son generalmente de pérdida de función, en lugar de mutaciones de ganancia de función. Sin embargo, existen varios ejemplos de inserciones que generan mutaciones de ganancia de función. La mutagénesis de inserción puede conseguirse usando técnicas convencionales de biología molecular.

#### b. Mutagénesis química

La mutagénesis química ofrece ciertas ventajas, tales como la capacidad de encontrar un rango completo de mutaciones con grados de severidad fenotípica, y es fácil y barata de realizar. La mayoría de los carcinógenos químicos producen mutaciones en el ADN. El benzo[a]pireno, N-acetoxi-2-acetil aminofluoreno y aflotoxina B1 causan transversiones GC a TA en bacterias y células de mamífero. El benzo[a]pireno también puede producir sustituciones de bases tales como AT a TA. Los compuestos de N-nitroso producen transiciones GC a AT. La alquilación de la posición O4 de la timina inducida por exposición a n-nitrosourea provoca transiciones de TA a CG.

#### c. Mutagénesis por radiación

Las moléculas biológicas se degradan por radiación ionizante. La adsorción de la energía incidente conduce a la formación de iones y radicales libres, y la rotura de algunos enlaces covalentes. La susceptibilidad a daño por radiación parece bastante variable entre moléculas, y entre diferentes formas cristalinas de la misma molécula. Depende de la dosis total acumulada, y t de la tasa de dosis (ya que una vez están presentes los radicales libres, el daño molecular que causan depende de su tasa de difusión natural y por tanto del tiempo real). El daño se reduce y se controlar preparando la muestra lo más fría posible. La radiación ionizante causa daño en el ADN, generalmente proporcional a la tasa de dosis.

En la presente descripción, la expresión "radiación ionizante" significa radiación que comprende partículas o fotones que tienen suficiente energía o pueden producir suficiente energía para producir ionización (ganancia o pérdida de electrones). Una radiación ionizante ejemplar y preferida es una radiación x. La cantidad de radiación ionizante necesaria en una célula dada o para una molécula particular generalmente depende de la naturaleza de esa célula o molécula y la naturaleza de la diana de mutación. Los medios para determinar una cantidad eficaz de radiación son bien conocidos en la técnica.

#### d. Mutagénesis por exploración *in vitro*

También puede introducirse mutagénesis aleatoria usando PCR propensa a errores. La tasa de mutagénesis puede aumentarse realizando PCR en múltiples tubos con diluciones de moldes. Una técnica particularmente útil de mutagénesis es mutagénesis por exploración con alanina en que varios restos se sustituyen individualmente con el aminoácido alanina de modo que puedan determinarse los efectos de perder interacciones de cadenas laterales, minimizando al mismo tiempo el riesgo de perturbaciones a gran escala en la conformación proteica (Cunningham *et al.*, 1989).

La mutagénesis de saturación por exploración *in vitro* proporciona un método rápido para obtener una gran cantidad de información de estructura-función incluyendo: (i) identificación de restos que modulan la especificidad de unión a ligando, (ii) una mejor comprensión de la unión a ligando basada en la identificación de esos aminoácidos que retienen la actividad y esos que anulan la actividad en una localización dada, (iii) una evaluación de la plasticidad global de un sitio activo o subdominio proteico, (iv) identificación de sustituciones de aminoácidos que provocan unión aumentada.

## 2. Mutagénesis dirigida al sitio

5 La mutagénesis dirigida al sitio guiada por estructura representa una poderosa herramienta para la disección y diseño de interacciones proteína-ligando (Wells, 1996; Braisted *et al.*, 1996). La técnica proporciona la preparación y ensayo de variantes de secuencia introduciendo uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en un ADN seleccionado.

### C. Vectores

10 Para generar mutaciones en un genoma de rhabdovirus, pueden codificarse polipéptidos nativos y modificados por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico vehículo en que puede insertarse una secuencia exógena de ácido nucleico para su introducción en una célula donde puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", que  
15 significa que es foránea a la célula en que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en que la secuencia no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales, y virus de plantas), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un especialista en la técnica estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes convencionales, que se describen en *Sambrook et al.* (2001) y Ausubel *et al.* (1994).  
20

Además de codificar un polipéptido modificado tal como proteína N, proteína P, proteína M, proteína G, o proteína L modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas tales como una marca o molécula de direccionamiento. Los vectores útiles que codifican dichas proteínas de fusión incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*,  
25 1985), vectores que codifican un tramo de histidinas, y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S-transferasa (GST) para posterior purificación y separación o escisión. Una molécula de direccionamiento es una que dirige el polipéptido modificado a un órgano, tejido, célula, u otra localización particular en el cuerpo de un sujeto. Como alternativa, la molécula de direccionamiento altera el tropismo de un organismo, tal como rhabdovirus por ciertos tipos celulares, por ejemplo, células cancerosas.  
30

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, se traducen moléculas de ARN en una proteína, polipéptido, o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener diversas "secuencias de control",  
35 que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida de forma funcional en un organismo hospedador particular. Además de secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen otras funciones también y se describen infra.  
40

### 1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en que están controlados el inicio y la tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos que se unen a proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones "posicionado  
45 de forma funcional", "acoplado de forma funcional", "unido de forma funcional", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcional correcta en relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o expresión de esa secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis implicada en la activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico.  
50

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con un gen o secuencia, que pueden obtenerse por aislamiento de las secuencias no codificantes 5' localizadas cadena arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor pueden mencionarse como "endógeno". Asimismo, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, localizado cada abajo o cadena arriba de esa secuencia. Como  
55 alternativa, se obtendrán ciertas ventajas posicionando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de otras células procariontas, virus, o células eucariotas, y promotores o potenciadores que no "existen de forma natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión.  
60

Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de forma sintética, las secuencias pueden producirse usando tecnología de clonación recombinante y/o amplificación de ácido nucleico, incluyendo PCR™, en relación a las composiciones descritas en este documento (véase la patente de Estados Unidos  
65

4.683.202, la patente de Estados Unidos 5.928.906). Además, se contempla que pueden emplearse también las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares.

5 Naturalmente, puede ser importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija de forma eficaz la expresión del segmento de ADN en el tipo celular, orgánulo, y organismo elegidos para la expresión. Los especialistas en la técnica de biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipo celular para la expresión de proteínas, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (2001). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, selectivos de célula (es decir, más activos en un tipo celular en comparación con otro), inducibles, y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir un alto nivel de expresión del segmento de ácido nucleico introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

15 Varios elementos/promotores que pueden emplearse, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión de un gen. Esta lista no pretende ser exhaustiva de todos los elementos posibles implicados en la promoción de la expresión sino, simplemente, es ejemplar de los mismos. También se proporcionan ejemplos de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que pueden activarse en respuesta a un estímulo específico. El promotor/potenciador (referencias) incluyen: cadena pesada de inmunoglobulina (Banerji *et al.*, 1983; Gilles *et al.*, 1983; Grosschedl *et al.*, 1985; Atchinson *et al.*, 1986, 1987; Imler *et al.*, 1987; Weinberger *et al.*, 1984; Kiledjian *et al.*, 1988; Porton *et al.*, 1990); cadena ligera de inmunoglobulina (Queen *et al.*, 1983; Picard *et al.*, 1984); receptor de células T (Luria *et al.*, 1987; Winoto *et al.*, 1989; Redondo *et al.*, 1990); HLA DQ a y/o DQ  $\beta$  (Sullivan *et al.*, 1987); interferón  $\beta$  (Goodbourn *et al.*, 1986; Fujita *et al.*, 1987; Goodbourn *et al.*, 1988); interleuquina-2 (Greene *et al.*, 1989); receptor de interleuquina-2 (Greene *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990); MHC Clase II 5 (Koch *et al.*, 1989); MHC Clase II HLA-DR $\alpha$  (Sherman *et al.*, 1989);  $\beta$ -actina (Kawamoto *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1989); creatina quinasa muscular (MCK) (Jaynes *et al.*, 1988; Horlick *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989); prealbúmina (transtiretina) (Costa *et al.*, 1988); elastasa I (Omitz *et al.*, 1987); metalotioneína (MTII) (Karin *et al.*, 1987; Culotta *et al.*, 1989); colagenasa (Pinkert *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987); albúmina (Pinkert *et al.*, 1987; Tronche *et al.*, 1989, 1990);  $\alpha$ -fetoproteína (Godbout *et al.*, 1988; Campere *et al.*, 1989);  $\gamma$ -globina (Bodine *et al.*, 1987; Perez-Stable *et al.*, 1990);  $\beta$ -globina (Trudel *et al.*, 1987); c-fos (Cohen *et al.*, 1987); c-HA-ras (Triesman, 1986; Deschamps *et al.*, 1985); insulina (Edlund *et al.*, 1985); molécula de adhesión de células neurales (NCAM) (Hirsh *et al.*, 1990);  $\alpha$ 1-antitripaína (Latimer *et al.*, 1990); histona H2B (TH2B) (Hwang *et al.*, 1990); colágeno de ratón y/o tipo I (Ripe *et al.*, 1989); proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78) (Chang *et al.*, 1989); hormona de crecimiento de rata (Larsen *et al.*, 1986); amiloide A de suero humano (SAA) (Edbrooke *et al.*, 1989); troponina I (TN I) (Yutzey *et al.*, 1989); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Pech *et al.*, 1989); distrofia muscular de Duchenne (Klamut *et al.*, 1990); SV40 (Banerji *et al.*, 1981; Moreau *et al.*, 1981; Sleight *et al.*, 1985; Firak *et al.*, 1986; Herr *et al.*, 1986; Imbra *et al.*, 1986; Kadesch *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986; Ondek *et al.*, 1987; Kuhl *et al.*, 1987; Schaffner *et al.*, 1988); polioma (Swartzendruber *et al.*, 1975; Vasseur *et al.*, 1980; Katinka *et al.*, 1980, 1981; Tyndell *et al.*, 1981; Dandolo *et al.*, 1983; de Villiers *et al.*, 1984; Hen *et al.*, 1986; Satake *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 1988); retrovirus (Kriegler *et al.*, 1982, 1983; Levinson *et al.*, 1982; Kriegler *et al.*, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze *et al.*, 1986; Miksicek *et al.*, 1986; Celander *et al.*, 1987; Thiesen *et al.*, 1988; Celander *et al.*, 1988; Chol *et al.*, 1988; 1Reisman *et al.*, 1989); virus de papiloma (Campo *et al.*, 1983; Lusky *et al.*, 1983; Spandidos y Wilkie, 1983; Spalholz *et al.*, 1985; Lusky *et al.*, 1986; Cripe *et al.*, 1987; Gloss *et al.*, 1987; Hirochika *et al.*, 1987; Stephens *et al.*, 1987); virus de la hepatitis B (Bulla *et al.*, 1986; Jameel *et al.*, 1986; Shaul *et al.*, 1987; Spandau *et al.*, 1988; Vannice *et al.*, 1988); virus de la inmunodeficiencia humana (Muesing *et al.*, 1987; Hauber *et al.*, 1988; Jakobovits *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1988; Takebe *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1988; Berkhout *et al.*, 1989; Laspia *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1989; Braddock *et al.*, 1989); citomegalovirus (CMV) (Weber *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1985; Foecking *et al.*, 1986); y virus de la leucemia del simio gibón (Holbrook *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1989).

50 Los elementos inducibles (elemento/inductor (referencias)) incluyen: MT II/éster de forbol (TFA), metales pesados (Palmiter *et al.*, 1982; Haslinger *et al.*, 1985; Searle *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1985; Imagawa *et al.*, 1987; Karin *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987b; McNeill *et al.*, 1989); MMTV (virus del tumor mamario del ratón)/glucocorticoides (Huang *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1981; Majors *et al.*, 1983; Chandler *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Ponta *et al.*, 1985; Sakai *et al.*, 1988); interferón  $\beta$ /poli(rl)x, poli(rc) (Tavernier *et al.*, 1983); Adenovirus 5 E2/E1A (Imperiale *et al.*, 1984); colagenasa/éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987a); estromelislina/éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); SV40/éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); gen MX murino/interferón, virus de la enfermedad de Newcastle (Hug *et al.*, 1988); gen GRP78/A23187 (Resendez *et al.*, 1988);  $\alpha$ -2-macroglobulina/IL-6 (Kunz *et al.*, 1989); vimentina/suero (Rittling *et al.*, 1989); gen H-2Kb de MHC clase I/interferón (Blonar *et al.*, 1989); HSP70/EIA, antígeno T grande de SV40 (Taylor *et al.*, 1989, 1990a, 1990b); proliferina/éster de forbol-TPA (Mordacq *et al.*, 1989); factor de necrosis tumoral/PMA (Hensel *et al.*, 1989); y gen  $\alpha$  de hormona estimuladora de tiroides/hormona tiroides (Chatterjee *et al.*, 1989).

65 La identidad de promotores o elementos específicos de tejido o selectivos de tejido (es decir, promotores que tienen una actividad mayor en una célula en comparación con otra), así como ensayos para caracterizan su actividad, es bien conocida para los especialistas en la técnica. Ejemplos de dichas regiones incluyen el gen LIMK2 humano (Nomoto *et al.* 1999), el gen del receptor 2 de somatostatina (Kraus *et al.*, 1998), el gen de unión a ácido retinoico

del epidídimo murino (Lareyre *et al.*, 1999), CD4 humana (Zhao-Emonet *et al.*, 1998), alfa2 (XI) colágeno de ratón (Tsumaki, *et al.*, 1998), gen del receptor de dopamina D1A (Lee, *et al.*, 1997), factor II de crecimiento tipo insulina (Wu *et al.*, 1997), molécula-1 de adhesión celular endotelial de plaquetas humanas (Almendro *et al.*, 1996), y el promotor SM22a.

5 Promotores virales adicionales, promotores/potenciadores celulares y promotores/potenciadores inducibles que podrían usarse en combinación con la presente invención se enumeran en este documento. Además también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según la base de datos de promotores eucariotas EPDB) para dirigir la expresión de genes estructurales que codifican enzimas de procesamiento de oligosacáridos, proteínas accesorias de plegamiento de proteínas, proteínas marcadoras de selección o una proteína heteróloga de interés. Como alternativa, puede emplearse un promotor específico de tejido para terapia génica contra el cáncer (Tabla 2) o el direccionamiento a tumores (Tabla 3) con las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

**Tabla 2.** Promotores candidatos específicos de tejido para terapia génica contra el cáncer

Promotor específico de tejido	Cánceres en que el promotor es activo	Células normales en que el promotor es activo
Antígeno carcinoembrionario (CEA)*	La mayoría de carcinomas colorrectales; 50 % de carcinomas de pulmón; 40-50 % de carcinomas gástricos; la mayoría de carcinomas pancreáticos; muchos carcinomas de mama	Mucosa colónica; mucosa gástrica; epitelio pulmonar; glándulas sudoríparas ecrinas; células en testículos
Antígeno específico de próstata (PSA)	La mayoría de carcinomas de próstata	Epitelio de próstata
Péptidos intestinal vasoactivo (VIP)	La mayoría de cánceres pulmonares no microcíticos	Neuronas; linfocitos; mastocitos; eosinófilos
Proteína tensioactiva A (SP-A)	Muchas células de adenocarcinomas pulmonares	Neumocitos tipo II; Clara
Homólogo humano de achaete-scute (hASH)	La mayoría de cánceres pulmonares microcíticos	Células neuroendocrinas en pulmón
Mucina-1 (MUC1)**	La mayoría de adenocarcinomas (que se originan a partir de cualquier tejido)	Células epiteliales glandulares en mama y en tracto respiratorio, gastrointestinal, y genitourinario
Alfa-fetoproteína	La mayoría de carcinomas hepatocelular; posiblemente muchos cánceres testiculares	Hepatocitos (en ciertas condiciones); testículos
Albúmina	La mayoría de carcinomas hepatocelulares	Hepatocitos
Tirosinasa	La mayoría de melanomas	Melanocitos; astrocitos; células de Schwann; algunas neuronas
Proteína de unión a tirosina (TRP)	La mayoría de melanomas	Melanocitos; astrocitos, células de Schwann; algunas neuronas
Queratina 14	Presumiblemente muchos carcinomas de células escamosas (por ejemplo: cánceres de cabeza y cuello)	Queratinocitos
EBV LD-2	Muchos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello	Queratinocitos del tracto digestivo superior
Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP)	Muchos astrocitomas	Astrocitos
Proteína básica de mielina (MBP)	Muchos gliomas	Oligodendrocitos
Enzima convertidora de angiotensina específico de testículo (ACE específica de testículo)	Posiblemente muchos cánceres testiculares	Espermatazoo
Osteocalcina	Posiblemente muchos osteosarcomas	Osteoblastos

**Tabla 3.** Promotores candidatos para su uso con un direccionamiento específico de tejido de tumores

Promotor	Cánceres en que el promotor es activo	Células normales en que el promotor es activo
Promotor regulado por E2F	Casi todos los cánceres	Células en proliferación
HLA-G	Muchos carcinomas colorrectales; muchos melanomas; posiblemente muchos otros cánceres	Linfocitos; monocitos; espermatocitos; trofoblastos
FasL	La mayoría de melanomas; muchos carcinomas pancreáticos; la mayoría de	Leucocitos activados: neuronas; células endoteliales;
	astrocitomas posiblemente muchos otros cánceres	queratinocitos; células en tejidos inmunoprivilegiados; algunas células en pulmones, ovarios, hígado, y próstata
Promotor regulado por Myc	La mayoría de carcinomas pulmonares (tanto microcíticos como no microcíticos); la mayoría de carcinomas colorrectales	Células en proliferación (solamente algunos tipos celulares): células epiteliales mamarias (incluyendo no proliferantes)
MAGE-1	Muchos melanomas; algunos carcinomas pulmonares no microcíticos; algunos carcinomas de mama	Testículo
VEGF	70 % de todos los cánceres (sobre-expresión constitutiva en muchos cánceres)	Células en sitios de neovascularización (pero a diferencia de tumores, la expresión es transitoria, menos fuerte, y nunca constitutiva)
bFGF	Presumiblemente muchos cánceres diferentes, ya que la expresión de bFGF se induce por condiciones isquémicas	Células en sitios de isquemia (pero a diferencia de tumores, la expresión es transitoria, menos fuerte, y nunca constitutiva)
COX-2	La mayoría de carcinomas colorrectales; muchos carcinomas pulmonares; posiblemente muchos otros cánceres	Células en sitios de inflamación
IL-10	La mayoría de carcinomas colorrectales; muchos carcinomas pulmonares; muchos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello; posiblemente muchos otros cánceres	Leucocitos
GRP78/BiP	Presumiblemente muchos cánceres diferentes, ya que la expresión de GRP78 se induce por condiciones específicas de tumor	Células en sitios de isquemia
Elementos CarG de Egr-1	Inducidos por radiación de ionización, de modo que de forma concebible la mayoría de los tumores tras radiación	Células expuestas a radiación ionizante; leucocitos

**2. Señales de inicio y sitios internos de unión al ribosoma**

- 5 También puede ser necesaria una señal de inicio específica para una traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede necesitarse proporcionar señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de inicio ATG. Un especialista en la técnica sería fácilmente capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de inicio debe estar "en fase" con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales exógenas de control de la traducción y codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos apropiados potenciadores de la transcripción.

15 En ciertos aspectos de la invención, el uso de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) se usa para crear mensajes multigén, o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de superar el modelo de exploración con ribosoma de la traducción dependiente de capuchón metilado 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito los elementos IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden ligarse a fases de lectura abierta heterólogas. Pueden transcribirse múltiples fases de lectura abierta juntas, cada una separada por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada fase de lectura abierta es accesible a los ribosomas para una traducción eficaz. Pueden expresarse de forma eficaz múltiples genes usando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véanse las patentes de Estados Unidos 5.925.565 y 5.935.819).

25

### 3. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante convencional para digerir el vector. (Véase Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, y Cocea, 1997). "Digestión con enzima de restricción" se refiere a escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solamente en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas está ampliamente comprendido por los especialistas en la técnica. Frecuentemente, se linealiza o fragmenta un vector usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para posibilitar que secuencias exógenas se ligen al vector: "Ligamiento" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden estar contiguos o no entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligamiento son bien conocidas para los especialistas en la técnica de tecnología recombinante.

### 4. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención generalmente comprenderán al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" está compuesto por secuencias de ARN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Por tanto, en ciertas realizaciones se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de transcrito de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para conseguir niveles deseables de mensaje.

En virus de ARN con sentido negativo, incluyendo rhabdovirus, la terminación se define por un motivo de ARN.

Los terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador conocido de la transcripción descrito en este documento o conocido para los especialistas en la técnica, incluyendo aunque sin limitación, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tales como por ejemplo el terminador de la hormona del crecimiento bovino o secuencias virales de terminación, tales como por ejemplo el terminador de SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser una ausencia de secuencia transcribible o traducible, tal como debido a un truncamiento de secuencia.

### 5. Señales de poliadenilación

En expresión, particularmente expresión eucariota, normalmente se incluirá una señal de poliadenilación para efectuar la apropiada poliadenilación del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica satisfactoria de la invención, y/o puede emplearse cualquiera de estas secuencias. Realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, conveniente y/o conocida por funcionar bien en diversas células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

### 6. Orígenes de replicación

Para propagar un vector en una célula hospedadora, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo llamados "ori"), que es una secuencia específica de ácido nucleico en que se inicia la replicación. Como alternativa puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula hospedadora es de levadura.

### 7. Marcadores de selección y exploración

En ciertos aspectos de la invención, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permite una fácil identificación de células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite su selección. Un marcador de selección positiva es uno en que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativa es uno en que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a fármaco.

Habitualmente la inclusión de un marcador de selección por fármaco ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basada en la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores incluyendo marcadores de exploración tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Como alternativa, pueden utilizarse enzimas de exploración tales como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un especialista en la técnica también conocería el modo de emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis FACS. No se cree que el marcador usado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Ejemplos adicionales de marcadores de selección y exploración son bien conocidos para los

especialistas en la técnica.

#### D. Células hospedadoras

5 Como se usa en este documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" pueden usarse de forma intercambiable. Todas estas expresiones también incluyen su descendencia, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales. En el contexto de la expresión de una secuencia heteróloga de ácido nucleico, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptora de vectores o virus (que no se califica como vector si no expresa polipéptidos exógenos). Una célula hospedadora puede estar "transfectada" o "transformada", que se refiere a un proceso por el cual el ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia codificante de proteína modificada, se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula objeto primaria y su descendencia.

15 Las células hospedadoras pueden derivarse de procariotas o eucariotas, incluyendo células de levadura, células de insecto, y células de mamífero, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de parte o todas las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector. Están disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para su uso como una célula hospedadora, y pueden obtenerse a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo para cultivos vivos y materiales genéticos ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Un hospedador apropiado puede determinarse por un especialista en la técnica basada en la estructura de vector y el resultado deseado. Un plásmido o cósmido, por ejemplo, puede introducirse en una célula hospedadora procariota para su replicación en muchos vectores. Las células bacterianas usadas como células hospedadoras para la replicación y/o expresión del vector incluyen DH5 $\alpha$ , JM109, y KC8, así como varios hospedadores bacterianos disponibles en el mercado tales como células competentes SURE® y células SOLOPACK™ Gold (STRATAGENE® La Jolla, CA). Como alternativa, podrían usarse células bacterianas tales como *E. coli* LE392 como células hospedadoras para virus fágicos. Las células de levadura apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*.

30 Ejemplos de células hospedadoras eucariotas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, y PC12. Están disponibles muchas células hospedadoras de diversos tipos celulares y organismos y serían conocidas para los especialistas en la técnica. Asimismo, puede usarse un vector viral junto con una célula hospedadora eucariota o procariota, particularmente una que sea permisiva para la replicación o expresión del vector.

35 Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que les permiten replicarse y/o expresarse en células tanto procariotas como eucariotas. Un especialista en la técnica comprendería adicionalmente las condiciones bajo las cuales incubar todas las células hospedadoras descritas anteriormente para mantenerlas y para permitir la replicación de un vector. También se entienden y conocen las técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas, o péptidos afines.

#### E. Sistemas de expresión

45 Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos todo o parte de las composiciones analizadas anteriormente. Pueden emplearse sistemas basados en procariotas y/o eucariotas para su uso con la presente invención para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos afines. Muchos de estos sistemas están disponibles en el mercado y ampliamente.

50 El sistema de célula de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteína de un segmento heterólogo de ácido nucleico, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.871.986 y 4.879.236, y que puede comprarse, por ejemplo, con el nombre MAXBAC® 2.0 de INVITROGEN® y el SISTEMA DE EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS BACPACK™ de CLONTECH®.

55 Además de los sistemas de expresión descritos de la invención, otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamífero inducible COMPLETE CONTROL™ de STRATAGENE®, que implica un receptor sintético inducible por ecidisona, o su sistema de expresión pET, un sistema de expresión de *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible en INVITROGEN®, que porta el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamífero inducible que usa el promotor CMV de longitud completa. INVITROGEN® también proporciona un sistema de expresión de levadura llamado el sistema de expresión de *Pichia metanolica*, que está diseñado para producción de alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia metanolica*. Un especialista en la técnica conocería el modo de expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína, o péptido afín.

65

## F. Detección de ácido nucleico

Además de su uso para dirigir la expresión de proteínas, polipéptidos y/o péptidos de poxvirus, las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento tienen otros diversos usos. Por ejemplo, tienen utilidad como sondas o cebadores para realizaciones que implican hibridación de ácidos nucleicos. Pueden usarse en métodos de diagnóstico o selección de la presente invención. La detección de ácidos nucleicos que codifican rhabdovirus o moduladores polipeptídicos de rhabdovirus están abarcada por la invención.

### 1. Hibridación

El uso de una sonda o cebador entre 13 y 100 nucleótidos, preferiblemente entre 17 y 100 nucleótidos de longitud, o en algunos aspectos de la invención hasta 1-2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Generalmente se prefieren moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tramos contiguos mayores de 20 bases de longitud, para aumentar la estabilidad y/o selectividad de las moléculas híbridas obtenidas. Generalmente se prefiere diseñar moléculas de ácido nucleico para hibridación que tengan una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más largas donde se desee. Dichos fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante.

Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la descripción pueden usarse por su capacidad de formar de forma selectiva moléculas dúplex con tramos complementarios de ADN y/o ARN o para proporcionar cebadores para amplificación de ADN o ARN a partir de muestras. Dependiendo de la aplicación concebida, se desearía emplear condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda o cebadores por la secuencia diana.

Para aplicaciones que requieren alta selectividad, normalmente se deseará emplear condiciones de rigurosidad relativamente elevada para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de contenido salino relativamente bajo y/o alta temperatura, tal como se proporciona por aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Dichas condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si lo hay, desapareamiento entre la sonda o los cebadores y el molde o hebra diana y serían particularmente adecuadas para el aislamiento de genes específicos o para detectar transcritos específicos de ARNm. Es generalmente apreciado que las condiciones pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

Para ciertas aplicaciones, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, se aprecia que se prefieren condiciones de menor rigurosidad. En estas condiciones, la hibridación puede suceder incluso aunque las secuencias de las hebras de hibridación no sean perfectamente complementarias, sino que están desapareadas en una o más posiciones. Las condiciones pueden volverse menos rigurosas aumentando la concentración salina y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, podrían proporcionarse condiciones de rigurosidad media por aproximadamente 0,1 a 0,25 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 37°C a aproximadamente 55°C, mientras que podrían proporcionarse condiciones de baja rigurosidad por aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas que varían de aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. Las condiciones de hibridación pueden manipularse fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otras realizaciones, la hibridación puede conseguirse en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ditiotretitol 1,0 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir aproximadamente Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, a temperaturas que varían de aproximadamente 40°C a aproximadamente 72°C.

En ciertos aspectos, será ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con un medio apropiado, tal como un marcador, para determinar la hibridación. Se conoce una amplia diversidad de medios indicadores apropiados en la técnica, incluyendo ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que son capaces de detectarse. En realizaciones preferidas, puede desearse emplear un marcador fluorescente o una marca enzimática tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radiactivos u otros reactivos ambientalmente indeseables. En el caso de marcas enzimáticas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que pueden emplearse para proporcionar un medio de detección que es visiblemente o espectrofotométricamente detectable, para identificar hibridación específica con muestras que contienen ácido nucleico complementario.

En general, se concibe que las sondas o cebadores descritos en este documento serán útiles como reactivos en hibridación en solución, como en PCR<sup>TM</sup>, para la detección de expresión de genes correspondientes, así como en aspectos que emplean una fase sólida. Aquí, el ADN de ensayo (o ARN) se adsorbe o fija de otro modo a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico monocatenario fijado después se somete a hibridación con sondas seleccionadas en condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido

nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación particular de interés es bien conocida para los especialistas en la técnica. Después de lavar las moléculas hibridadas para retirar moléculas de sonda unidas de forma no específica, se detecta la hibridación, y/o cuantifica, determinando la cantidad de marcador unido. Se describen métodos de hibridación en fase sólida representativos en las patentes de Estados Unidos 5.843.663, 5.900.481 y 5.919.626. Se describen otros métodos de hibridación que pueden usarse en la práctica de la presente invención en las patentes de Estados Unidos 5.849.481, 5.849.486 y 5.851.772.

## 2. Amplificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos usados como molde para amplificación pueden aislarse de células, tejidos u otras muestras de acuerdo con metodologías convencionales (Sambrook *et al.*, 2001). En ciertas realizaciones, el análisis se realiza sobre homogenados de células completas o tejido o muestras de fluido biológico sin purificación sustancial del ácido nucleico molde. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN celular fraccionado o completo. Cuando se usa ARN, puede desearse convertir primero el ARN en ADN complementario.

Se entiende que el término "cebador", como se usa en este documento, abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde. Normalmente, los cebadores son oligonucleótidos de diez a veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria.

Se ponen en contacto pares de cebadores diseñados para hibridar de forma selectiva con ácidos nucleicos correspondientes a secuencias de genes identificados en este documento con el ácido nucleico molde en condiciones que permiten hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de alta rigurosidad que solamente permitirán la hibridación con secuencias que son completamente complementarias a los cebadores. En otras realizaciones, la hibridación puede suceder en rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más desapareamientos con las secuencias cebadoras. Una vez hibridado, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también mencionadas como "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

Están disponibles varios procesos dependientes de molde para amplificar las secuencias oligonucleotídicas presentes en una muestra de molde dada. Uno de los mejores métodos de amplificación conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (mencionada como PCR<sup>TM</sup>) que se describe con detalle en las patentes de Estados Unidos 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis *et al.*, 1988.

Puede realizarse un procedimiento de amplificación por PCR<sup>TM</sup> con transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado y es bien conocido (véase Sambrook *et al.*, 2001; documento WO 90/07641; y patente de Estados Unidos 5.882.864).

Otro método para amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), descrita en la solicitud europea N° 320 308. La patente de Estados Unidos 4.883.750 describe un método similar a LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana. También puede usarse un método basado en PCR<sup>TM</sup> y ensayo de ligasa de oligonucleótidos (OLA), descrito en la patente de Estados Unidos 5.912.148. Se describen métodos alternativos para la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana que pueden usarse en la práctica de la presente invención en las patentes de Estados Unidos 5.843.650, 5.846.709, 5.846.783, 5.849.546, 5.849.497, 5.849.547, 5.858.652, 5.866.366, 5.916.776, 5.922.574, 5.928.905, 5.928.906, 5.932.451, 5.935.825, 5.939.291 y 5.942.391, la solicitud GB N° 2 202 328, y en la solicitud PCT N° PCT/US89/01025. La Qbeta Replicasa, descrita en la solicitud PCT N° PCT/US87/00880, también puede usarse como método de amplificación en la presente invención. También puede usarse la amplificación isotérmica como se describe por Walker *et al.* (1992). Así como la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), descrita en la patente de Estados Unidos 5.916.779.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS), incluyendo amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh *et al.*, 1989; solicitud PCT WO 88/10315). La solicitud europea N° 329 822 describe un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica sintetizar de forma cíclica ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc, y ADN bicatenario (ADNbc), que puede usarse de acuerdo con la presente invención.

La solicitud PCT WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una región promotora/secuencia cebadora con un ADN monocatenario ("ADNmc") diana seguida de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; Ohara *et al.*, 1989).

### 3. Detección de ácidos nucleicos

Después de cualquier amplificación, puede ser deseable separar y/o aislar el producto de amplificación del molde y/o el exceso de cebador. En un aspecto los productos de amplificación se separan por electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida, o poliacrilamida usando métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 2001).

La separación de ácidos nucleicos también puede realizarse por técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Existen muchos tipos de cromatografía que pueden usarse en la práctica de la presente invención, incluyendo cromatografía de adsorción, reparto, intercambio iónico, en hidroxilapatita, con tamiz molecular, en fase inversa, en columna, en papel, en capa fina, y de gases sí como HPLC.

Los métodos típicos de visualización incluyen tinción de un gel con bromuro de etidio y visualización de las bandas bajo luz UV. Como alternativa, si los productos de amplificación se marcan de forma integral con nucleótidos marcados radio- o fluorométricamente, los productos de amplificación separados pueden exponerse a película de rayos x o visualizarse en los espectros de excitación apropiados.

En aspectos particulares la detección es por transferencia de Southern e hibridación con una sonda marcada. Las técnicas implicadas en transferencia de Southern son bien conocidas para los especialistas en la técnica (véase Sambrook *et al.*, 2001). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de Estados Unidos 5.279.721, que describe un aparato y método para la electroforesis y transferencia automatizada de ácidos nucleicos.

Otros métodos de detección de ácidos nucleicos que pueden usarse en la práctica de la presente invención se describen en las patentes de Estados Unidos 5.840.873, 5.843.640, 5.843.651, 5.846.708, 5.846.717, 5.846.726, 5.846.729, 5.849.487, 5.853.990, 5.853.992, 5.853.993, 5.856.092, 5.861.244, 5.863.732, 5.863.753, 5.866.331, 5.905.024, 5.910.407, 5.912.124, 5.912.145, 5.919.630, 5.925.517, 5.928.862, 5.928.869, 5.929.227, 5.932.413 y 5.935.791.

### 4. Otros ensayos

Pueden usarse otros métodos para selección genética dentro del alcance de la presente descripción por ejemplo, para detectar mutaciones en ácidos nucleicos genómicos, ADNc y/o muestras de ARN. Los métodos usados para detectar mutaciones puntuales incluyen electroforesis en gel con gradiente desnaturizante ("DGGE"), análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción ("RFLP"), métodos de escisión química o enzimática, secuenciación directa de regiones diana amplificadas por PCR™ (véase anteriormente), análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria ("SSCP") y otros métodos bien conocidos en la técnica. Un método para seleccionar mutaciones puntuales se basa en escisión con RNasa de desapareamientos de pares de bases en heterodúplex de ARN/ADN o ARN/ARN. Como se usa en este documento, el término "desapareamiento" se define como una región de uno o más nucleótidos no apareados o mal apareados en una molécula bicatenaria de ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN. Esta definición por tanto incluye desapareamientos debidos a mutaciones de inserción/delección, así como mutaciones puntuales de una o múltiples bases (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos 4.946.773. Se describen métodos alternativos para la detección de mutaciones de delección, inserción o sustitución que pueden usarse en la práctica de la presente invención en las patentes de Estados Unidos 5.849.483, 5.851.770, 5.866.337, 5.925.525 y 5.928.870.

### G. Métodos de transferencia génica

Se cree que los métodos adecuados para suministro de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de composiciones de la presente descripción incluyen casi cualquier método por el cual puede introducirse un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo vectores virales y no virales) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en este documento o como conocería un especialista en la técnica. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, suministro directo de ácido nucleico tal como por inyección (patentes de Estados Unidos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, 1985; patente de Estados Unidos 5.789.215); por electroporación (patente de Estados Unidos 5.384.253); por precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando DEAE dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991); por bombardeo con microproyectiles (solicitudes PCT N° WO 94/09699 y 95/06128; patentes de Estados Unidos 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler *et al.*, 1990; patentes de Estados Unidos 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de Estados Unidos 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omriulleh *et al.*, 1993; patentes de Estados Unidos 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como éstas, puede transformarse de forma estable o transitoria uno o más orgánulos, células, tejidos u organismos.

## H. Componentes y restos lipídicos

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados con un ácido nucleico, una molécula de aminoácido, tal como un péptido, u otro compuesto de molécula pequeña.

5 En cualquiera de los ejemplos analizados en este documento, la molécula puede ser un polipéptido de rhabdovirus o un modulador polipeptídico de rhabdovirus, por ejemplo un ácido nucleico que codifica todo o parte de cualquiera de un polipéptido de rhabdovirus, o como alternativa, una molécula de aminoácidos que codifica todo o parte del modulador polipeptídico de rhabdovirus. Un lípido es una sustancia que es característicamente insoluble en agua y se puede extraer con un disolvente orgánico. Compuestos diferentes a los descritos específicamente en este documento son entendidos por un especialista en la técnica como lípidos, y están abarcados por las composiciones y métodos de la presente invención. Un componente lipídico y un no lípido pueden unirse entre sí, de forma covalente o no covalente.

15 Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido es habitualmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica, e incluyen por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos ligados por éter y éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

20 Una molécula de ácido nucleico o molécula de aminoácidos, tal como un péptido, asociada con un lípido puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, contenerse en forma de una suspensión en un lípido o asociarse de otro modo con un lípido. Una composición asociada a lípido o lípido/virus de la presente invención no está limitada a ninguna estructura particular. Por ejemplo, también pueden simplemente esparcirse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". En otro ejemplo no limitante, también se contempla un complejo de lipofectamina (Gibco BRL)-poxvirus o Superfect (Qiagen)-virus.

30 En ciertos aspectos, una composición lipídica puede comprender aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 21 %, aproximadamente un 22 %, aproximadamente un 23 %, aproximadamente un 24 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 26 %, aproximadamente un 27 %, aproximadamente un 28 %, aproximadamente un 29 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 31 %, aproximadamente un 32 %, aproximadamente un 33 %, aproximadamente un 34 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 36 %, aproximadamente un 37 %, aproximadamente un 38 %, aproximadamente un 39 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 41 %, aproximadamente un 42 %, aproximadamente un 43 %, aproximadamente un 44 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 46 %, aproximadamente un 47 %, aproximadamente un 48 %, aproximadamente un 49 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 51 %, aproximadamente un 52 %, aproximadamente un 53 %, aproximadamente un 54 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 56 %, aproximadamente un 57 %, aproximadamente un 58 %, aproximadamente un 59 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 61 %, aproximadamente un 62 %, aproximadamente un 63 %, aproximadamente un 64 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 66 %, aproximadamente un 67 %, aproximadamente un 68 %, aproximadamente un 69 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 71 %, aproximadamente un 72 %, aproximadamente un 73 %, aproximadamente un 74 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 76 %, aproximadamente un 77 %, aproximadamente un 78 %, aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 81 %, aproximadamente un 82 %, aproximadamente un 83 %, aproximadamente un 84 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 86 %, aproximadamente un 87 %, aproximadamente un 88 %, aproximadamente un 89 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 100 %, o cualquier intervalo derivable de los mismos, de un lípido particular, tipo lipídico, o componente no lipídico tal como un fármaco, proteína, azúcar, ácidos nucleicos u otro material descritos en este documento o que conociera un especialista en la técnica. En un ejemplo no limitante, una composición lipídica puede comprender aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % de lípidos neutros, y aproximadamente un 33 % a aproximadamente un 34 % de un cerebrosido, y aproximadamente un 1 % de colesterol. Por tanto, se contempla que las composiciones lipídicas de la presente invención pueden comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos, u otros componentes en cualquier combinación o intervalo porcentual.

## IV. Formulaciones farmacéuticas y regímenes de tratamiento

65 En un aspecto de la presente invención, se contempla un método de tratamiento para una enfermedad hiperproliferativa o neoplásica, tal como cáncer, mediante el suministro de un rhabdovirus no VSV, tal como virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs, y/o virus Bahia Grande. Ejemplos de cáncer contemplados para el

tratamiento incluyen cáncer pulmonar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer óseo, cáncer testicular, cáncer cervical, cáncer gastrointestinal, linfomas, lesiones pre-neoplásicas, lesiones pre-neoplásicas en el pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer de vejiga y cualquier otro cáncer o tumor que pueda tratarse, incluyendo cánceres metastásicos o distribuidos de forma sistémica.

5 Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, generalmente, se define como esa cantidad suficiente para ralentizar, mejorar, reducir, minimizar, o limitar de forma detectable y repetida el grado de la enfermedad o sus síntomas. Pueden aplicarse definiciones más rigurosas, incluyendo eliminación, erradicación, o cura de la enfermedad.

10 Preferiblemente, los pacientes tendrán una función adecuada de la médula ósea (definida como un recuento absoluto de granulocitos periféricos de  $> 2.000/\text{mm}^3$  y un recuento de plaquetas de  $100.000/\text{mm}^3$ ), una función hepática adecuada (bilirrubina  $< 1,5 \text{ mg/dl}$ ) y una función renal adecuada (creatinina  $< 1,5 \text{ mg/dl}$ ).

15 **A. Administración**

Para eliminar células, inhibir el crecimiento celular, inhibir la metástasis, disminuir el tamaño del tumor o tejido, y revertir de otro modo, suspender, o reducir el fenotipo maligno de células tumorales, usando los métodos y composiciones de la presente invención, generalmente se pondría en contacto una célula hiperproliferativa o neoplásica con una composición terapéutica tal como un virus o una construcción de expresión que codifica un polipéptido. Las vías de administración variarán, naturalmente, con la localización y naturaleza de la lesión, e incluyen, por ejemplo, administración y formulación intradérmica, transdérmica, parenteral, intravascular, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, regional, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intra-arterial, intravesical, intratumoral, por inhalación, perfusión, lavado, inyección directa, alimentaria, y oral.

25 Para lograr un efecto terapéutico con respecto a una afección o enfermedad vascular, se pondría en contacto una célula vascular con el compuesto terapéutico. Cualquiera de las formulaciones y vías de administración analizadas con respecto al tratamiento o diagnóstico del cáncer también puede emplearse con respecto a enfermedades y afecciones vasculares.

30 Se contempla la inyección intratumoral, o inyección en la vasculatura tumoral para tumores concretos, sólidos, accesibles. También se contempla la administración local, regional o sistémica, particularmente para aquellos cánceres que están diseminados o tienen probabilidad de diseminarse de forma sistémica. Las partículas virales pueden administrarse mediante al menos o como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 inyecciones.

35 En el caso de intervención quirúrgica, la presente invención puede usarse de forma preoperatoria, para dejar a un tumor inoperable expuesto a resección. Como alternativa, la presente invención puede usarse en el momento de la cirugía, y/o después de ello, para tratar la enfermedad residual o metastásica. Por ejemplo, un lecho de tumor resecaado puede inyectarse o perfundirse con una formulación que comprende un polipéptido de rhabdovirus o un rhabdovirus, que puede albergar o no una mutación, que es ventajosa para el tratamiento del cáncer o células cancerosas. La perfusión puede continuarse después de la resección, por ejemplo, dejando un catéter implantado en el sitio de la cirugía. También se concibe el tratamiento post-quirúrgico periódico.

45 También puede aplicarse administración continua cuando sea apropiado, por ejemplo, cuando se escinde un tumor y el lecho del tumor se trata para eliminar la enfermedad residual, microscópica. Se prefiere el suministro mediante una jeringa o cateterización. Dicha perfusión continua puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1-2 horas, a aproximadamente 2-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o más tiempo después del inicio del tratamiento. Generalmente, la dosis de la composición terapéutica mediante perfusión continua será equivalente a la dada mediante una única inyección o múltiples inyecciones, ajustada para un periodo de tiempo durante el cual sucede la perfusión. Se contempla adicionalmente que puede usarse la perfusión en las extremidades para administrar composiciones terapéuticas de la presente invención, particularmente en el tratamiento de melanomas y sarcomas.

55 Los regímenes de tratamiento también pueden variar, y a menudo dependen del tipo de tumor, la localización del tumor, la progresión de la enfermedad, y la salud y edad del paciente. Obviamente, ciertos tipos de tumor requerirán tratamiento más agresivo, mientras que al mismo tiempo, ciertos pacientes no pueden tolerar protocolos más duros. El médico será el más adecuado para tomar dichas decisiones basándose en la eficacia y toxicidad conocidas (si las hay) de las formulaciones terapéuticas.

60 En ciertos aspectos, el tumor que se está tratando puede no ser, al menos inicialmente, resecaable. Los tratamientos con construcciones virales terapéuticas pueden aumentar la resecaabilidad del tumor debido a encogimiento en los márgenes o por eliminación de ciertas partes particularmente invasivas. Después de los tratamientos, puede ser posible la resección. Tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán para eliminar la enfermedad residual microscópica en el sitio del tumor.

65 Un curso típico de tratamiento, para un tumor primario o un lecho tumoral post-escisión, implicará múltiples dosis. El

tratamiento típico de tumores primarios implica una aplicación de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dosis sobre un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 semanas o más. Puede repetirse un régimen de dos semanas una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más veces. Durante un curso de tratamiento, puede re-evaluarse la necesidad de completar las dosificaciones planificadas.

5 Los tratamientos pueden incluir diversas "dosis unitarias". La dosis unitaria se define como la que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad a administrarse, y la vía particular y formulación, pertenecen a las habilidades de los especialistas en la técnica clínica. Una dosis unitaria no tiene que administrarse como una única inyección sino que puede comprender infusión continua sobre un periodo establecido de tiempo. La dosis unitaria de la presente invención puede describirse convenientemente en términos de unidades formadoras de placas (pfu) o partículas virales para construcciones virales. Las dosis unitarias varían de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  pfu o vp y mayor. Como alternativa, dependiendo del tipo de virus y el título que se puede obtener, se suministrarán de 1 a 100, 10 a 50, 100-1000, o hasta aproximadamente  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ , o  $1 \times 10^{15}$  o más partículas virales (vp) infecciosas al paciente o a las células del paciente.

### B. Composiciones y formulaciones inyectables

20 El método preferido para el suministro de una construcción de expresión o virus que codifica todo o parte de un genoma de rhabdovirus a células cancerosas o tumorales en la presente invención es mediante inyección intravascular. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden administrarse, como alternativa, por vía intratumoral, parenteral, intravenosa, intra-arterial, intradérmica, intramuscular, transdérmica o incluso intraperitoneal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.543.158, 5.641.515 y 5.399.363.

25 La inyección de construcciones de ácido nucleico puede suministrarse mediante una jeringa o cualquier otro método usado para inyección de una solución, siempre que la construcción de expresión pueda pasar a través del calibre particular de aguja necesario para la inyección (por ejemplo véanse las patentes de Estados Unidos 5.846.233 y 5.846.225).

30 Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclados con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de Estados Unidos 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida al grado que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La apropiada fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido primero debe volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral, e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los especialistas en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente aparecerá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por los gobiernos de los países en que se están usando las composiciones.

65 Las composiciones descritas en este documento pueden formularse en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos

carboxilo libres también puede obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Como se usa en este documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien comprendida en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de su inyección.

### C. Tratamientos de combinación

Los compuestos y métodos de la presente descripción pueden usarse en el contexto de enfermedades/afecciones hiperproliferativas o neoplásicas incluyendo cáncer y aterosclerosis. Para aumentar la eficacia de un tratamiento con las composiciones de la presente invención, tal como rhabdovirus, puede ser deseable combinar estas composiciones con otros agentes eficaces en el tratamiento de esas enfermedades y afecciones. Por ejemplo, el tratamiento de un cáncer puede implementarse con compuestos terapéuticos de la presente invención y otras terapias anti-neoplásicas, tales como agentes anti-neoplásicos o cirugía.

Pueden emplearse diversas combinaciones; por ejemplo, un rhabdovirus no VSV, tal como virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs, y/o virus Bahia Grande, es "A" y la terapia anti-neoplásica secundaria es "B", que puede incluir un segundo rhabdovirus:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B  
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A  
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración del virus terapéutico o construcciones virales de la presente descripción a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de esa terapia secundaria particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del tratamiento con virus. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según lo necesario. También se contempla que pueden aplicarse diversas terapias convencionales, así como intervención quirúrgica, en combinación con la terapia descrita con la célula cancerosa o tumoral.

#### 1. Terapia anti-neoplásica

Un agente "anti-neoplásico" es capaz de afectar de forma negativa al cáncer en un sujeto, por ejemplo, eliminando las células cancerosas, induciendo apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia o cantidad de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento del tumor, reduciendo el suministro sanguíneo a un tumor o células cancerosas, promoviendo una respuesta inmune contra las células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando la longevidad de un sujeto con cáncer. Los agentes anti-neoplásicos incluyen agentes biológicos (bioterapia), agentes quimioterapéuticos, y agentes radioterapéuticos. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para eliminar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar el contacto de las células con virus o construcción viral y el uno o más agentes o múltiples factores a la misma vez. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, a la misma vez, donde una composición incluye el virus y la otra incluye el segundo agente o agentes.

La resistencia de las células tumorales a agentes quimioterapéuticos y radioterapéuticos representa un problema principal en oncología clínica. Un objetivo de la actual investigación sobre el cáncer es encontrar modos de mejorar la eficacia de la quimio- y radioterapia combinándola con terapia génica. Por ejemplo, el gen de la timidina quinasa del herpes simple (HS-tK), cuando se suministró a tumores cerebrales por un sistema de vector retroviral, indujo de forma satisfactoria la susceptibilidad al agente antiviral ganciclovir (Culver *et al.*, 1992). En el contexto de la presente invención, se contempla que podría usarse terapia con poxvirus de forma similar junto con intervención

quimioterapéutica, radioterapéutica, inmunoterapéutica, u otra intervención biológica, además de otros agentes pro-apoptóticos o reguladores del ciclo celular.

5 Como alternativa, una terapia viral puede preceder o seguir al otro tratamiento por intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones donde el otro agente y el virus se aplican por separado a la célula, generalmente se aseguraría que no concluya un periodo significativo de tiempo entre el momento de cada suministro, de modo que el agente y el virus aún sean capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que puede ponerse en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-24 h entre sí y, más preferiblemente, en aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, sin embargo, donde transcurren varios días (2, 10 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

#### a. Quimioterapia

15 Las terapias contra el cáncer también incluyen diversas terapias de combinación con tratamientos tanto basados en agentes químicos como en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, 20 temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier análogo o derivado variante de los anteriores. La combinación de quimioterapia con terapia biológica se conoce como bioquimioterapia.

#### b. Radioterapia

25 Otros factores que causan daño al ADN y se han usado de forma extensiva incluyen los que se conoce comúnmente como rayos  $\gamma$ , rayos X, haces de protones, y/o el suministro dirigido de radioisótopos a células tumores. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores logren un amplio intervalo de daños sobre el ADN, sobre los precursores de ADN, sobre la replicación y reparación del ADN, y sobre el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante periodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían 30 ampliamente, y dependen de la semi-vida del isótopo, la fuerza y tipo de la radiación emitida, y la captación por las células neoplásicas.

35 Las expresiones "en contacto" y "expuesta", cuando se aplican a una célula, se usan en este documento para describir el proceso por el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se suministran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir eliminación o estasis celular, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para eliminar la 40 célula o evitar que se divida.

#### c. Inmunoterapia

45 Los agentes inmunoterapéuticos, generalmente, se basan en el uso de células efectoras y moléculas inmunes para abordar y destruir células cancerosas. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador sobre la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo en solitario puede servir como efector de terapia o puede reclutar otras células para lograr realmente la eliminación celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina colérica, toxina de pertussis, etc.) y sirve simplemente como agente de direccionamiento. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que 50 porta una molécula superficial que interacciona, directa o indirectamente, con una diana celular tumoral. Diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK. La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, actividad citotóxica directa e inhibición o reducción de ciertos rhabdovirus o polipéptidos de rhabdovirus proporcionaría beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer.

55 La inmunoterapia también podría usarse como parte de una terapia combinada. El enfoque general para terapia combinada se analiza a continuación. En un aspecto de inmunoterapia, la célula tumoral debe albergar algún marcador que sea susceptible a direccionamiento, es decir, no esté presente en la mayoría de las demás células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de éstos puede ser adecuado para direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, 60 antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Sialil antígeno Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155. También pueden usarse lisados de células tumorales en una composición antigénica.

65 Un aspecto alternativo de inmunoterapia es combinar efectos antineoplásicos con efectos inmunoestimuladores. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen: citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, IFN $\gamma$ , quimioquinas tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento tales como ligando FLT3. Combinar moléculas

inmunoestimuladoras, como proteínas o usar suministro génico en combinación con un supresor tumoral ha demostrado potenciar los efectos anti-tumorales (Ju *et al.*, 2000).

Como se ha analizado anteriormente, ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son adyuvantes inmunes (por ejemplo, Mycobacterium bovis, Plasmodium falciparum, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos) (patentes de Estados Unidos 5.801.005 y 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998), terapia con citoquinas (por ejemplo, interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; IL-1, GM-CSF y TNF) (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998), terapia génica (por ejemplo, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; patentes de Estados Unidos 5.830.880 y 5.846.945) y anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anti-gangliósido GM2, anti-HER-2, anti-p185) (Pietras *et al.*, 1998; Hanibuchi *et al.*, 1998; patente de Estados Unidos 5.824.311). Herceptin (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal quimérico (ratón-humano) que bloquea el receptor HER2-neu (Dillman, 1999). La terapia de combinación del cáncer con herceptin y quimioterapia ha demostrado ser más eficaz que las terapias individuales. Por tanto, se contempla que puede emplearse una o más terapias anti-neoplásicas con las terapias relacionadas con rhabdovirus descritas en este documento.

### (1) Inmunoterapia pasiva

Existen varios enfoques diferentes para inmunoterapia pasiva del cáncer. Pueden clasificarse ampliamente en los siguientes: inyección de anticuerpos solos; inyección de anticuerpos acoplados a toxinas o agentes quimioterapéuticos; inyección de anticuerpos acoplados a isótopos radiactivos; inyección de anticuerpos anti-idiotipo; y finalmente, purga de células tumorales en médula ósea.

Preferiblemente, se emplean anticuerpos monoclonales humanos en inmunoterapia pasiva, ya que producen pocos o ningún efecto secundario en el paciente. Sin embargo, su aplicación está algo limitada por su escasez y hasta ahora se han administrado solamente de forma intralesional. Los anticuerpos monoclonales humanos contra antígenos de gangliósido se han administrado de forma intralesional a pacientes que padecen melanoma cutáneo recurrente (Irie y Morton, 1986). Se observó regresión en seis de diez pacientes después de inyecciones intralesionales, diarias o semanales. En otro estudio, se consiguió éxito moderado a partir de inyecciones intralesionales de dos anticuerpos monoclonales humanos (Irie *et al.*, 1989).

Puede ser favorable administrar más de un anticuerpo monoclonal dirigido contra dos antígenos diferentes o incluso anticuerpos con múltiple especificidad antigénica. Los protocolos de tratamiento también pueden incluir la administración de linfoquinas u otros potenciadores inmunes como se describe por Bajorin *et al.* (1988). El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos se describe en detalle adicional en otra parte en la memoria descriptiva.

### (2) Inmunoterapia activa

En inmunoterapia activa, se administra un péptido, polipéptido o proteína antigénica, o una composición de células tumorales autólogas o alogénicas o "vacuna", generalmente con un adyuvante bacteriano distinto (Ravindranath y Morton, 1991; Morton *et al.*, 1992; Mitchell *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1993). En inmunoterapia de melanoma, los pacientes que producen una alta respuesta de IgM a menudo sobreviven mejor que aquellos que no producen o producen pocos anticuerpos IgM (Morton *et al.*, 1992). Los anticuerpos IgM a menudo son anticuerpos transitorios y la excepción a la norma parece ser los anticuerpos anti gangliósido o anticarbohidrato.

### (3) Inmunoterapia adoptiva

En inmunoterapia adoptiva, los linfocitos en circulación del paciente, o los linfocitos infiltrados en tumor, se aíslan *in vitro*, se activan por linfoquinas tales como IL 2 o se transducen con genes para necrosis tumoral, y se readministran (Rosenberg *et al.*, 1988; 1989). Para conseguir esto, se administraría a un animal, o paciente humano, una cantidad inmunológicamente eficaz de linfocitos activados en combinación con una composición de péptido antigénico incorporado a adyuvante como se describe en este documento. Los linfocitos activados serán más preferiblemente las propias células del paciente que se aislaron previamente de una muestra de sangre o tumor y se activaron (o "expandieron") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y carcinoma renal, pero el porcentaje de respondedores fue pequeño en comparación con el de los que no respondieron.

#### d. Genes

En otro ejemplo más, el tratamiento secundario es una terapia génica en que un polinucleótido terapéutico se administra antes, después, o al mismo tiempo que se administra un rhabdovirus. El suministro de un rhabdovirus junto con un vector que codifica uno de los siguientes productos génicos tendrá un efecto anti-neoplásico combinado sobre tejidos diana. Como alternativa, el rhabdovirus puede modificarse por ingeniería como un vector viral para incluir el polinucleótido terapéutico. Se abarca diversas proteínas dentro de la invención, algunas de las cuales se describen a continuación. La Tabla 4 enumera diversos genes que pueden abordarse para terapia génica de alguna forma en combinación con la presente invención.

**(1) Inductores de proliferación celular**

Las proteínas que inducen proliferación celular recaen adicionalmente en diversas categorías dependientes de la función. El elemento en común de todas estas proteínas es su capacidad de regular la proliferación celular. Por ejemplo, una forma de PDGF, el oncogén sis, es un factor de crecimiento secretado. Los oncogenes raramente surgen de genes que codifican factores de crecimiento, y actualmente, sis es el único factor de crecimiento oncogénico de origen natural conocido. En una realización de la presente invención, se contempla que se usa ARNm anti-sentido dirigido a un inductor particular de proliferación celular para evitar la expresión del inductor de proliferación celular.

**(2) Inhibidores de proliferación celular**

Los oncogenes supresores tumorales funcionan inhibiendo la excesiva proliferación celular. La inactivación de estos genes destruye su actividad inhibidora, provocando proliferación no regulada. Los supresores tumorales incluyen p53, p16 y C-CAM. Otros genes que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención incluyen Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1 p73, VHL, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, fusiones p27/p16, fusiones p21/p27, genes anti-trombóticos (por ejemplo, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, genes implicados en angiogénesis (por ejemplo, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF, o sus receptores) y MCC.

**(3) Reguladores de la muerte celular programada**

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal, que mantiene la homeostasis en tejidos adultos, y que suprime la carcinogénesis (Kerr *et al.*, 1972). La familia Bcl-2 de proteínas y proteasas tipo ICE han demostrado ser importantes reguladores y efectores de la apoptosis en otros sistemas. La proteína Bcl 2, descubierta en asociación con linfoma folicular, desempeña un papel prominente en el control de la apoptosis y la potenciación de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). La proteína Bcl-2 evolutivamente conservada está ahora reconocida como un miembro de una familia de proteínas relacionadas, que pueden clasificarse como agonistas de muerte o antagonistas de muerte.

Después de su descubrimiento, se demostró que Bel 2 actúa suprimiendo la muerte celular desencadenada por diversos estímulos. Además, ahora es evidente que existe una familia de proteínas reguladoras de muerte celular Bcl-2 que comparten en común homologías estructurales y de secuencia. Estos diferentes miembros de la familia han demostrado poseer funciones similares a Bel 2 (por ejemplo, BclXL, BclW, BclS, Mcl-1, A1, Bfl-1) o contrarrestar la función Bel 2 y promover la muerte celular (por ejemplo, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

**e. Cirugía**

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer experimentará cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento contra el cáncer que puede usarse junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye resección en que todo o parte del tejido canceroso se retira físicamente, escinde, y/o destruye. La resección tumoral se refiere retirada física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento por cirugía incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía, y cirugía controlada de forma microscópica (cirugía de Mohs). Se contempla adicionalmente que la presente descripción puede usarse junto con la retirada de cánceres superficiales, pre-cánceres, o cantidades incidentales de tejido normal.

Tras la escisión de parte o todas las células cancerosas, tejido, o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anti-neoplásica adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de dosificaciones variables también.

**f. Otros agentes**

Se contempla que pueden usarse otros agentes en combinación con la presente descripción para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan a la regulación positiva de receptores de superficie celular y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos, u otros agentes biológicos. Los agentes inmunomoduladores incluyen factor de necrosis tumoral; interferón  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; IL-2 y otras citoquinas; F42K y otros análogos de citoquinas; o MIP-1, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES, y otras quimioquinas. Se contempla adicionalmente que la regulación positiva de receptores de superficie celular o sus ligandos tales como Fas/ligando de Fas, DR4 o DR5/TRAIL (ligando de Apo-2) potenciaría la capacidad

de inducción apoptótica de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino sobre células hiperproliferativas. Aumentos de la señalización intercelular elevando la cantidad de uniones GAP aumentarían los efectos anti-hiperproliferativos sobre la población celular hiperproliferativa adyacente. En otros aspectos, pueden usarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia anti-hiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente invención. Ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) y Lovastatina. Se contempla adicionalmente que podrían usarse otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a apoptosis, tal como el anticuerpo c225, en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento.

Ha habido muchos avances en la terapia del cáncer después de la introducción de fármacos quimioterapéuticos citotóxicos. Sin embargo, una de las consecuencias de la quimioterapia es el desarrollo/adquisición de fenotipos resistentes a fármacos y el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos. El desarrollo de resistencia a fármacos sigue siendo un obstáculo principal en el tratamiento de dichos tumores y por lo tanto, existe una necesidad obvia de enfoques alternativos tales como terapia viral.

Otra forma de terapia para su uso junto con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica incluye hipertermia, que es un procedimiento en que el tejido de un paciente se expone a altas temperaturas (hasta 41,11°C (106°F)). Dispositivos de calentamiento externo o interno pueden estar implicados en la aplicación de hipertermia local, regional, o del cuerpo entero. La hipertermia local implica la aplicación de calor a una pequeña área, tal como un tumor. El calor puede generarse de forma externa con ondas de alta frecuencia dirigidas a un tumor desde un dispositivo fuera del organismo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, incluyendo cables delgados calentados o tubos huecos rellenos con agua caliente, antenas de microondas implantadas, o electrodos de radiofrecuencia.

Un órgano o extremidad de un paciente se calienta para terapia regional, que se consigue usando dispositivos que producen alta energía, tales como imanes. Como alternativa, puede retirarse algo de sangre del paciente y calentarse antes de perfundirse en un área que se calentará de forma interna. El calentamiento del organismo completo también puede implementarse en casos donde el cáncer se ha propagado por todo el cuerpo. Pueden usarse mantas de agua caliente, cera caliente, bobinas inductivas, y cámaras térmicas para este propósito.

También puede usarse terapia hormonal junto con la presente invención o en combinación con cualquier otra terapia contra el cáncer descrita previamente. El uso de hormonas puede emplearse en el tratamiento de ciertos cánceres tales como cáncer de mama, próstata, ovario, o cervical para disminuir el nivel o bloquear los efectos de ciertas hormonas tales como testosterona o estrógeno. Este tratamiento a menudo se usa en combinación con al menos una terapia diferente contra el cáncer como tratamiento.

## V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no pretenden limitar la presente invención de ningún modo. Un especialista en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para realizar los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos objetos, fines y ventajas inherentes en este documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en este documento son actualmente representativos de las realizaciones preferidas, son ejemplares, y no se pretenden como limitaciones sobre el alcance de la invención.

### Ejemplo comparativo 1

#### Selección de nuevos rhabdovirus candidatos oncolíticos

**Selecciones *in vitro*.** Como selección inicial para identificar nuevos virus oncolíticos, se evaluaron aislados de campo de rhabdovirus para su capacidad de eliminar células tumorales humanas del panel celular NCI 60. Ésta ha sido una estrategia fructífera para los inventores en el pasado para determinar la eficacia relativa de una serie de mutantes VSV como candidatos oncolíticos (que lisan células cancerosas). Inicialmente, los inventores han examinado 13 nuevos rhabdovirus que se ha determinado previamente que se replican en células de mamífero. Se contempla que este procedimiento se ampliará para estudiar rhabdovirus para los cuales existe menos experiencia en cultivo celular. En un esfuerzo por hacer una selección rápida y eficazmente a través de una matriz de 60 células infectadas con 13 virus diferentes, los inventores usan un ensayo rápido y económico en formato de 96 pocillos usando reducción de MTS a formazán, o tinción con violeta cristal de células residuales, para medir el número y la viabilidad celular. Los inventores cultivan líneas celulares hasta el 80 % de confluencia en placas de 96 pocillos y después las exponen en paralelo a nuestros aislados de campo de rhabdovirus a MOI crecientes (MOI = 0,0001 - 10 PFU/célula). A las 48 y 96 horas post infección, las células se tiñen con reactivo MTS acuoso (Promega EEUU) y se incuban durante 3 horas para permitir suficiente formación de formazán. Como alternativa, las placas de células infectadas se lavan con tampón para retirar las células muertas, se tienen con colorante violeta cristal, se lavan para retirar el colorante residual, tiempo después del cual el colorante se solubiliza usando detergente. Estas placas después se leen usando el lector de placa multipocillo integrado (Biotek SynergyHT; EEUU), se ajusta la curva de

datos, y se determina la  $EC_{50}$  a partir de esta curva. Normalmente, los ensayos se realizan en sextuplete, con los valores mayor e inferior de  $EC_{50}$  eliminados, y promediando los cuatro restantes  $EC_{50}$  para determinar finalmente un valor e intervalo de confianza. (Por ejemplo véase la FIG. 2)

- 5 Como contra-selección para evaluar si un virus particular infecta/elimina células humanas normales *in vitro*, se explorarán cultivos de fibroblastos humanos normales, epitelio y endotelio y cultivos neuronales de la colección de los inventores y los disponibles en el mercado (Cambrex, EEUU). Los cultivos se infectarán con virus candidatos (0,1 a 20 pfu/célula) durante 48 y 96 horas. La viabilidad celular se detectará por ensayo MTS, o ensayo con violeta cristal, y se caracterizará adicionalmente por marcaje con anticuerpo D175 contra caspasa 3 activada (Cell Signaling Technologies, EEUU) y se detectará usando un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los estudios se harán en paralelo con líneas celulares conocidas de tumor humano y de ratón susceptible/resistente. Se ha usado una combinación de células no tratadas y células tratadas con TRAIL y ciclohexamida para establecer el intervalo dinámico del ensayo, con determinaciones de factor z preliminares significativamente por encima de 0,5.
- 10
- 15 Otra eventualidad es que los virus pueden replicarse y propagarse de forma eficaz en cultivos sin eliminación rápida de estas células. Éstos son también virus potencialmente interesantes, con la condición de que su replicación sea de naturaleza selectiva de tumor, ya que su capacidad lítica podría aumentarse posteriormente a través de ingeniería recombinante. Para detectar estos virus, los inventores infectarán células del panel celular NCI 60 con aislados de campo a una baja MOI (0,1 pfu/célula) en pocillos duplicados de una placa de 24 pocillos. Después de 1 hora, los pocillos se lavarán minuciosamente para retirar el virus introducido libre, se añadirá medio y los cultivos se incubarán durante 72 horas adicionales. Estos sobrenadantes de cultivo se titularán posteriormente en una línea celular permisiva (células Vero) para detectar y cuantificar la infección productiva. El lavado final de cada una de éstas se titulará para controlar el virus introducido residual. Los aciertos de virus candidato en este ensayo se confirmarán en células de cultivo tisular usando anticuerpos específicos de virus y microscopía de inmunofluorescencia convencional.
- 20
- 25

**Clasificación basada en todos los parámetros.** Varias propiedades contribuyen a la eliminación oncolítica de células tumorales incluyendo: capacidad de inducir apoptosis, tasa de producción de virus, cantidad de virus producido, así como funciones especiales tales como formación de sincitios. Los candidatos prometedores de la selección inicial se caracterizarán adicionalmente con respecto a la inducción de apoptosis (determinada por ensayo TUNEL y tinción de inmunofluorescencia para caspasa-3 activada), y curvas de crecimiento de una etapa para comparar la cinética y para cuantificar la producción de virus. Estos estudios servirán como guía para mejorar estas cepas. Por ejemplo: (1) si un virus elimina células tumorales bien pero muestra toxicidad inaceptable para células normales, los inventores atenuarán este virus usando una o más de las estrategias resumidas a continuación; (2) como alternativa, si un virus muestra cinética más lenta de eliminación manteniendo al mismo tiempo una alta tasa de replicación, entonces los inventores pueden añadir un transgén tóxico o terapéutico; (3) si un virus candidato se replica lentamente pero es un eliminador eficaz, el inventor seleccionará una variante con cinética de crecimiento aumentada para reforzar su potencia.

30

35

- 40 A partir de la experiencia de los inventores con VSV y otros virus oncolíticos, han identificado tres criterios de entrada *in vitro* clave para estrechar la lista de candidatos: (1) eliminación selectiva de células tumorales, (2) replicación productiva dentro de células tumorales (independiente de la eliminación), y (3) eficacia sobre líneas tumorales resistentes a VSV (melanoma UACC-62, pulmón A431 y NCI-H226, próstata DU-145, leucemia HL60). Basándose en estos criterios, los resultados de los ensayos de selección descritos anteriormente se integrarán para reducir la lista para evaluación adicional en ensayo *in vivo* preliminar.
- 45

**Toxicidad y biodistribución *in vivo*.** Las dos vías de administración relacionadas con un entorno clínico son inyecciones intravenosas (IV) e intracraneales (IC). Los candidatos principales identificados durante selección *in vitro* para la toxicidad y biodistribución en ratones después de infección se evaluarán por estas vías. Se infectarán grupos de 3 ratones por IV a dosis de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  pfu, o por IC a  $1 \times 10^2$  to  $1 \times 10^6$  pfu. Además de la mortalidad, se controlará la morbilidad diariamente para signos de letargia, deshidratación, pérdida de peso y parálisis de las extremidades. Se realizará histopatología sobre 2 ratones del grupo de dosis letal mínima (dosis más lata si no se consigue la dosis letal) de cada infección de virus candidato. La infección con VSV WT y simulada servirán como controles positivo y negativo apropiados respectivamente. Se recogerán los órganos del ratón restante en este grupo, se homogeneizarán y titularán como evaluación preliminar de la biodistribución del virus.

50

55

Para virus que presentan un intervalo de dosis letal aceptable, lo inventores evaluarán posteriormente la biodistribución en ratones que albergan tumor para identificar virus compatibles con administración sistémica. El inventor empleará tres de nuestros modelos de cáncer existentes que representan dianas orgánicas muy diferentes de relevancia clínica crítica: (1) carcinoma de colon de ratón CT-26 ( $1 \times 10^5$  células) inyectado por vía intravenosa para formar tumores pulmonares diseminados en ratones Balb/C singénicos (2), carcinoma de mama de ratón 4T1 ( $4 \times 10^5$  células) inyectado en la almohadilla grasa de ratones Balb/C singénicos para formar un único tumor primario con metástasis espontánea, y (3) células de glioblastoma humano U87 ( $1 \times 10^5$  células) implantadas de forma estereotáctica en la corteza de ratones desnudos. Se determinará una dosis tolerable máxima para cada virus y vía (IV o IC) a partir de los experimentos de toxicidad *in vivo* preliminares. Este valor servirá como dosis terapéutica inicial para estudios de biodistribución en ratones que albergan tumor. En grupos de 3 ratones, los tumores se

60

65

establecerán durante 1 semana y después se tratarán IV o IC con una única dosis de cada virus candidato a su respectiva MTD. Cuarenta y ocho horas post tratamiento, los animales se perfundirán con solución salina para enjuagar cualquier virus libre de la circulación, y los tumores y órganos se recogerán, homogeneizarán y titularán para cuantificar el virus infeccioso. De este modo, los inventores determinarán los virus que pueden suministrarse a sitios de tumor por inyección sistémica, así como la selectividad relativa por tumor de la replicación del virus *in vivo*.

**Re-clasificación.** Basándose en los perfiles de toxicidad, biodistribución, suministro sistémico y selectividad por tumor en estudios *in vivo*, los inventores seleccionarán los mejores candidatos para continuación con la caracterización detallada y desarrollo adicional.

### Ejemplo 2

#### Construcción de recombinantes

**Secuenciación y sistema recombinante.** Para facilitar una rápida investigación y desarrollo, la posterior producción de material clínico y para asegurar la seguridad y estabilidad de virus terapéuticos, los inventores clonarán y rescatarán formas recombinantes de virus seleccionados.

Se han clonado y rescatado muchos virus ARNmc de hebra negativa usando técnicas recombinantes convencionales. Los inventores emplearán estrategias similares que se han adoptado satisfactoriamente para virus ARNmc recombinantes presentados. En resumen, se aislará el genoma de un virus candidato por extracción de ARN (Qiagen Corp) de  $1 \times 10^9$  partículas purificadas de virus. El ARN genómico purificado después se ceba con hexámeros aleatorios y se transcribe de forma inversa en ADNc, posteriormente se convierte en bicatenario y se clona ligando adaptadores EcoRI, se fracciona por tamaño y finalmente se vuelve a ligar en un plásmido bacteriano digerido con EcoRI (pT7Blue; Novagen). El resultado es una biblioteca de fragmentos genómicos que pueden secuenciarse fácilmente por técnicas convencionales. A causa de la naturaleza de cebado aleatorio de esta biblioteca, esta estrategia no "capturará" los extremos 3' y 5' rigurosos. Para hacer esto los inventores ligan oligos a los extremos 3' o 5' del ARN genómico purificado usando ARN ligasa T4. Usando cebadores complementarios los oligos recién ligados que flanquean el genoma, los inventores amplifican por PCR y clonan los extremos del genoma para posterior secuenciación. Esta información de secuencia después se usa para diseñar cebadores específicos de extremo para amplificar el genoma completo, que después se clona en un plásmido especializado. El plásmido flanquea el genoma con un promotor T7 en un extremo y una ribozima de autoescisión de hepatitis delta y la secuencia terminadora T7 en el flanco opuesto. Cuando se transfecta en células A549 que expresan ARN polimerasa T7 (previamente infectadas con un virus vaccinia que expresa T7), este plásmido genera genomas virales en el citoplasma. En paralelo, las secuencias codificantes los virus para los genes N, P y L se clonan en plásmidos de expresión dirigidos por el promotor CMV. La co-transfección de la construcción de genoma con los plásmidos N, P y L en estas células A549 reconstituye el complejo de replicación viral en el genoma viral y provoca el rescate de virus infeccioso. Como prueba de principios, los inventores han clonado, manipulado genéticamente, y rescatado el virus Maraba usando este método. Véanse las FIG. 17 y FIG. 18 para ejemplos de virus relacionados con Maraba.

### Ejemplo 3

#### Optimización/aumento

Los rhabdovirus no VSV son virus salvajes; y como con todos los virus oncolíticos presentados hasta ahora, incluyendo VSV, los inventores predicen que estos aislados de campo se beneficiarán de la optimización adicional a través de selección *in vitro* y/o estrategias de ingeniería recombinante. Algunos candidatos pueden requerir atenuación (por ejemplo, virus Maraba) mientras que algunos pueden requerir aumento de su replicación y/o cinética de eliminación de tumores (por ejemplo, virus Muir Springs). Lo siguiente es un resumen de varias estrategias que emplearán los inventores para maximizar la eficacia de virus terapéuticos recién identificados.

**Mutaciones diseñadas por ingeniería.** El VSV bloquea el transporte de ARNm nuclear/citoplasmático como medio para vencer la inmunidad innata de la célula hospedadora. Los inventores han descrito previamente el diseño por ingeniería de mutaciones en la proteína M de VSV para desactivar esta actividad y atenuar selectivamente de ese modo este virus en células normales. Dado que otros miembros del género de los vesiculovirus también han demostrado esta capacidad (Chandipura, y viremia primaveral de la carpa) y la mayoría de los vesiculovirus secuenciados hasta ahora (VSV, Chandipura, Piry, Cocal, viremia primaveral de la carpa, Maraba) tienen el motivo de secuencia crítico requerido por VSV para su función, los inventores contemplan atenuar los rhabdovirus no VSV de un modo análogo al usado para VSV. Sin embargo, otros rhabdovirus tales como el de la rabia y el virus de la fiebre efímera bovina no tienen este motivo y no bloquean el transporte de ARNm nuclear citoplasmático y quizá no serán susceptibles a esta estrategia de atenuación. Como va habiendo más información disponible respecto a la interacción rhabdovirus/hospedador a partir de laboratorios del consorcio y otros, serán posibles manipulaciones adicionales guiadas por la estructura/función para atenuar estos virus.

**Transgenes.** Ahora existen varios informes para "armar" virus oncolíticos con genes suicida o mediadores inmunes

para aumentar su potencia. Los inventores se centrarán en añadir transgenes para aumentar la citotoxicidad de virus candidatos que muestran replicación eficaz, pero insuficiente eliminación tumoral. Los inventores tienen una lista ponderada por prioridad de transgenes que se están modificando por ingeniería actualmente en virus Maraba. Actualmente la clasificación consiste en: (1) factor inductor de apoptosis (AIF) - un homólogo de óxido-reductasa responsable del colapso y degradación de la cromatina de un modo independiente de caspasa. (2) HaraKiri - el más potente del miembro pro-apoptótico solamente BH3 de la familia Bcl-2 responsable de la inducción de apoptosis convencional dependiente de caspasa (PCD Tipo I). (3) XAF1 - un potente gen supresor tumoral e inhibidor directo de la familia IAP. (4) Atg4B - la proteasa clave responsable de iniciar la autofagia (PCD Tipo II).

Finalmente, podrían modificarse por ingeniería miembros de las vías intrínseca o extrínseca de muerte celular con Tat u otros dominios de transducción de proteínas a secretar de células infectadas por virus para inducir eliminación espectadora dentro de la masa tumoral. Los inventores siguen siendo conscientes de que otros efectos espectadores de eliminación pueden estar mediados a través de componentes de la inmunidad del hospedador contra el virus y/o tumor. Por tanto, una estrategia alternativa sería modificar por ingeniería uno o más transgenes para atraer células inmunes a sitios de infección. Las evidencias indican que la infección con virus de tumores pulmonares CT26 induce neutrófilos para infiltrar el tumor y causar un efecto espectador de eliminación apoptótica masiva.

**Evolución dirigida para mejorar rhabdovirus oncolíticos.** Se han descrito muchos ejemplos de evolución dirigida donde se aumentaba o disminuía la capacidad de replicación de una cepa viral precursora por pases en serie en cultivo celular de mamífero. Los rhabdovirus son particularmente susceptibles a este tipo de procedimiento ya que no existen como entidad individual, sino como una población de capas llamadas cuasi-especie. Los miembros de las cuasi-especies representan mutaciones puntuales del genoma dominante. Cuando se aplica una presión selectiva apropiada, el miembro más fuerte de la población se selecciona, y se convierte en el genoma dominante. Esto tiene tremenda utilidad en los esfuerzo por construir un mejor virus oncolítico porque proporciona una colección ya preparada de mutantes de la cual seleccionar una variante con mejores capacidades oncolíticas. Por tanto, para atenuar un candidato dado, los inventores seleccionarán mutantes de placa pequeña sobre fibroblastos primarios y posteriormente amplificarán este virus clonado en células tumorales para retro-selección frente a mutaciones no productivas (es decir, mutaciones que debilitan de forma uniforme, tales como mutaciones en la polimerasa, en oposición a discapacidades específicas en células/tejidos normales). Realizando esto en ciclos iterativos a alta MOI (10 pfu/célula), los inventores esperan aislar un mutante que mantenga una replicación robusta en células tumorales, pero que haya perdido la capacidad de infectar de forma productiva células normales sanas. Como alternativa, los inventores pueden aumentar la potencia de rhabdovirus no VSV, seleccionando replicadores más rápidos, o eliminadores más letales. Para acelerar la tasa de replicación de un virus candidato, los inventores realizarán rondas iterativas de infección/replicación en líneas celulares tumorales, pero en cada ronda posterior disminuirán el tiempo de recogida post infección. Esta presión de selección forzarán a los virus a evolucionar hacia una rápida replicación. Si es deseable una citotoxicidad potenciada, los inventores infectarán líneas celulares tumorales resistentes o recalcitrantes ( $1 \times 10^6$  células) con virus candidatos (MOI=1). Las células vivas posteriormente se teñirán con colorante vital JC1 para detectar eventos prematuros de apoptosis por citometría de flujo de dos colores. Las células que experimentan apoptosis se almacenarán en monocapas de células Vero para recuperar el virus que se replica dentro de las mismas. Las rondas iterativas de este ensayo, de nuevo con tiempos decrecientes de recogida, seleccionarán un fenotipo letal más rápidamente. Los virus mejorados de este modo se secuenciarán para mapear las alteraciones genéticas y contribuir a nuestros esfuerzos de análisis de estructura/función hacia una mejor comprensión de la biología de los rhabdovirus y la oncolisis. La selección genética reversa permite un enfoque imparcial para mejorar los rhabdovirus, y representa un buen complemento a los esfuerzos por hacer mejoras a través de ingeniería recombinante de transgenes o mutaciones racionales basadas en estudios de estructura/función.

#### **Ejemplo 4**

##### **Ensayo *in vivo* de nuevos rhabdovirus oncolíticos recombinantes**

Los inventores han elegido usar modelos ortotópicos de cáncer ya que recapitulan de forma más precisa la enfermedad clínica humana. Sin embargo, a diferencia de modelos de tumores subcutáneos, los tumores ortotópicos no son fácilmente accesibles y por lo tanto son difíciles de evaluar sin sacrificar al animal experimental. Para resolver este problema, se adopta una tecnología de imagen óptica multimodal que permite la formación de imágenes de forma no invasiva, y la medición repetida del crecimiento o regresión de los tumores implantados, así como el desarrollo o regresión de lesiones metastásicas distales. Los inventores tienen una plataforma de imágenes de animal completo completamente integrada y altamente sensible (IVIS 200; Xenogen Corp) que puede detectar fotones emitidos incluso desde el tejido profundo. Puede medir la luz fluorescente emitida por proteínas fluorescentes recombinantes tales como GFP así como detectar bioluminiscencia generada por luciferasa. Usando genes indicadores de luciferasa específicos de sustrato, uno expresado a partir del virus y el otro expresado a partir de células tumorales, los inventores pueden medir la bioluminiscencia resultante de la replicación del virus de forma concurrente con las mediciones del tumor. Para hacer esto los inventores han clonado YFP o una nueva RFP monomérica en fase con luciferasa de luciérnaga o una nueva luciferasa tipo renilla del copépodo marino *Gaussia princeps*. Entre estas dos secuencias codificante los inventores han diseñado una secuencia de "parada-reinicio" de

la traducción de 30 aminoácidos. Este pequeño motivo proviene del virus de la fiebre aftosa y permite la expresión estequiométrica de dos proteínas a partir de un único ARNm, es muy pequeño y no sufre de variabilidad de una célula a otra como los motivos IRES. Estas construcciones indicadoras duales se clonaron en vectores lentivirales, se empaquetaron en virus, y se usaron para establecer células de glioblastoma humano 4T1, CT26 y U87 marcadas con indicador estable. Estas líneas celulares se usan en tres modelos de tumor de ratón ortotópico: gliomas humanos U87 implantados de forma intracraneal en ratones desnudos CD-1; células de carcinoma de mama de ratón 4T1 implantadas en la almohadilla grasa de hembras Balb/C (modelo de enfermedad metastásica agresiva, espontánea); carcinoma de colon CT-26 inyectado en la vena de cola de ratones Balb/C (tumores diseminados en el pulmón). La elección del modelo ortotópico se predijo según los siguientes criterios: tumor agresivo, de desarrollo rápido, y por lo tanto difícil de tratar; representa dianas orgánicas muy diferentes; abarca sistemas hospedadores tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos.

Los primeros estudios serán para evaluar las características de respuesta a dosis en nuestros modelos para identificar una dosis óptima. A partir de experimentos preliminares de toxicidad, los inventores habrán definido una MTD para cada una de nuestras cepas candidatas en animales Balb/C que no albergan tumor. Por lo tanto, los inventores ensayarán dosis a partir de la MTD, disminuyendo en intervalos semi-log hasta  $1 \times 10^3$  pfu. Usando el IVIS para replicación de imágenes en los tumores establecidos, se estudiará la cinética del suministro de virus inicial y la duración de la posterior replicación como una función de la dosis. En estudios paralelos, los ratones se sacrificarán durante este curso de tiempo y se examinarán usando microscopía de fluorescencia para determinar el modo en que la dosis afecta a la capacidad de alcanzar todas las partes del tumor y las lesiones metastásicas distales. Se examinará el tejido sano para evaluar la replicación específica de tumor. Finalmente, se determinará la seguridad de cada dosis controlando los ratones para cualquier signo de morbilidad tal como pérdida de peso, deshidratación, y cambios en el comportamiento. Se evaluarán las respuestas del tumor a los virus en comparaciones lado a lado después de tratamiento IV de una única dosis. La sensibilidad y naturaleza cuantitativa de la tecnología de imágenes ópticas la hace idealmente adecuada para este propósito. Por tanto se establecerán tumores como se ha descrito anteriormente y se controlará el crecimiento o regresión tumoral después de la dosificación del virus y se compararán estos resultados con controles de virus inactivados por UV. Basándose en trabajos previos con VSV, se contempla que una dosis única puede no ser suficiente para regresiones completas y duraderas de los tumores. Esto necesita una serie de experimentos para determinar la cantidad y cronología de dosis más eficaces. En una estrategia similar a la descrita anteriormente, los inventores usarán modelos de tumor para desarrollar estrategias de dosificación máximamente eficaces. Esto se hará controlando al mismo tiempo el suministro del virus al tumor, la replicación, duración de la replicación en el lecho tumoral y la propagación a sitios tumorales distantes, en concierto con crecimiento/regresión tumoral. Además, los inventores examinarán la infiltración y activación de células inmunes en lechos tumorales y ganglios linfáticos adyacentes usando citometría de flujo e inmunohistoquímica como otro parámetro de actividad oncolítica. Finalmente, la eficacia se confirmará controlando estos ratones para supervivencia global, y/o el tiempo hasta progresión; comparando grupos tratados con virus con los tratados con virus inactivado por UV como controles. Un ejemplo del modelo animal puede encontrarse en la FIG. 13.

**Retorno a optimización/aumento.** Puede ser que se requieran varios ciclos de optimización y después re-ensayo para desarrollar finalmente un virus terapéutico máximamente eficaz. Por lo tanto, los inventores usarán los resultados del ensayo *in vivo* para guiar rondas adicionales de optimización biológica y/o recombinante y después re-ensayar en modelos de tumor.

**Tabla 4.** Eliminación celular mediada por rhabdovirus en el panel celular NCI 60. Las células del panel celular NCI 60 se sembraron en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 90%. Estas células se infectaron a diluciones log con diversos rhabdovirus, como se indica. Después de 48 horas, las monocapas se lavaron, se fijaron y se tincieron con violeta de cristal para valorar las células viables.

Los valores representan las pfu requeridas para eliminar el 50% de las células en 48 h.

Neoplasia	Línea celular	Chandípuira	Maraba	Carajas	Isfahan	Klamath	Sawgrass	VSV HR
NSC PULMÓN	A549- ATCC	<10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	≥ 10 <sup>5</sup>	NE	≥ 10 <sup>5</sup>
NSC PULMÓN	EKVX	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>		≥ 10 <sup>6</sup>			10 <sup>3</sup>
NSC PULMÓN	HOP92	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>		10 <sup>5</sup>			≤ 10 <sup>2</sup>
NSC PULMÓN	NCI-H226	≥ 10 <sup>6</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>				
NSC PULMÓN	NCI-H23	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>		≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>		≤ 10 <sup>2</sup>
MELANOMA	LOX IMVI	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>				≤ 10 <sup>2</sup>
MELANOMA	M 14	10 <sup>3</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>		≥ 10 <sup>6</sup>		10 <sup>5</sup>
MELANOMA	SK-MEL-2	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>					≤ 10 <sup>2</sup>
MELANOMA	MALME 3M	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>			10 <sup>5</sup>
MELANOMA	UACC-257	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>			≤ 10 <sup>2</sup>
MELANOMA	UACC-62	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>				≤ 10 <sup>6</sup>
LEUCEMIA	MOLT-4		10 <sup>3</sup>					≤ 10 <sup>2</sup>
LEUCEMIA	K-562		10 <sup>5</sup>					≤ 10 <sup>2</sup>
OVARIO	OVCAR-3		10 <sup>3</sup>					≤ 10 <sup>2</sup>
OVARIO	OVCAR-4	10 <sup>3</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
OVARIO	OVCAR-8	NE	≥ 10 <sup>6</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>	NE		NE	10 <sup>3</sup>
OVARIO	SK-OV-3	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	≤ 10 <sup>6</sup>		≥ 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>
SNC	SF-268		≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>				10 <sup>4</sup>
SNC	SF-539		≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>			10 <sup>5</sup>
SNC	SNB-19	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>				≤ 10 <sup>2</sup>
SNC	SNB-75	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	NE	10 <sup>5</sup>		≥ 10 <sup>6</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>
COLON	HT29	10 <sup>4</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>	NE	NE		NE	10 <sup>5</sup>
COLON	COLO 205	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>		≥ 10 <sup>6</sup>			10 <sup>3</sup>
COLON	HCT-15	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>			10 <sup>3</sup>
COLON	SW-620	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>			≤ 10 <sup>2</sup>
MAMA	HS 578T	≥ 10 <sup>6</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>			≥ 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>
MAMA	MDA-MB-435	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>			≤ 10 <sup>2</sup>
RENAL	TK-10	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>		10 <sup>4</sup>			10 <sup>4</sup>
RENAL	786-0	10 <sup>4</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>			10 <sup>5</sup>
RENAL	ACHN	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>		NE	≤ 10 <sup>2</sup>
RENAL	A498	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>				10 <sup>4</sup>
PROSTATA	DU-145		≤ 10 <sup>2</sup>		≥ 10 <sup>6</sup>			≥ 10 <sup>5</sup>
PROSTATA	PC-3		≤ 10 <sup>6</sup>		NE			≤ 10 <sup>2</sup>
COLON DE RATÓN	CT26	≤ 10 <sup>2</sup>	≤ 10 <sup>2</sup>	≥ 10 <sup>6</sup>	NE			≤ 10 <sup>2</sup>

**Tabla 5.** Comparación focalizada entre cuatro rhabdovirus. Las células del panel celular NCI 60 se sembraron en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 90 %. Estas células se infectaron a diluciones log con diversos rhabdovirus, como se indica. Después de 48 horas, las monocapas se lavaron, se fijaron y se tiñeron con violeta cristal para valorar las células viables. Los valores representan las pfu requeridas para eliminar el 50 % de las células en 48 h.

5

		Chandipura	Maraba	Carajas	VSV WT
Pulmón	A549	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$10^4$	$\geq 10^6$
	H226	$\geq 10^6$	$\geq 10^6$	$10^4$	$\leq 10^2$
Melanoma	M14	$10^3$	$\leq 10^2$	$10^3$	$10^5$
	Malme 3M	$10^3$	$10^5$	$10^5$	$10^5$
Leucemia	UACC-62		$\leq 10^2$	$10^3$	$\geq 10^6$
	K562		$10^5$		$10^3$
Ovario	OVCAR4	$10^3$	$\leq 10^2$	$10^5$	$10^3$
	OVCAR8		$\leq 10^6$	$\geq 10^6$	$10^3$
	SK-OV-3	$\leq 10^2$	$10^5$	$10^5$	$10^4$
SNC	SF268		$\leq 10^2$	$10^4$	$10^4$
	SF539	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$10^3$	$10^5$
Colon	HCT-15	$10^5$	$10^4$	$10^5$	$10^3$
Mama	HS578T	$\geq 10^6$	$\geq 10^6$		$10^4$
Renal	786-O	$10^4$	$\leq 10^2$	$10^5$	$10^5$
	ACHN	$10^5$	$10^3$	$10^5$	$\leq 10^2$
Próstata	DU-145		$\leq 10^2$		$\geq 10^6$
	PC-3		$\leq 10^6$		$\leq 10^2$

Las diferencias entre VSV y otros rhabdovirus sobre el panel celular NCI 60 incluyen: (1) eliminación preferencial por virus Maraba en comparación con VSV de pulmón A549, melanoma M14, melanoma UACC-62, SNC SF268, SNC SF539, renal 786-O, próstata DU-145; (2) eliminación preferencial por virus Carajas en comparación con VSV para melanoma M14, melanoma UACC-62, SNC SF539; eliminación preferencial por VSV para pulmón H226, leucemia K562, ovario OVCAR-8, mama HCT-15, HS578T, y próstata PC-3. Todas las demás líneas celulares del panel celular 60 muestran susceptibilidades similares a VSV, Maraba y Carajas y Chandipura.

10

**Tabla 6.** Eliminación *in vitro* de células transformadas e inmortalizadas seleccionadas por nuevos rhabdovirus. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se permitió que alcanzaran un 75 % de confluencia. Estas células se infectaron posteriormente con cada virus a un título fijo. Los cultivos se valoraron visualmente para muerte celular después de 96 h. 4+ = 100 % destruido, 3+ = 75-90 % muerto, 2+ = 50 % muerto, 1+ = <30 % muerto. -- = sin muerte.

15

		Farmington	Muir Springs	Rio Grande	Ngaingan	Tibrogargan	Le Dantec	Kwatta
Humano	293T	++++	++++	+++	++	+		
Ratón	4T1	+	+	++	+			
Humano	SW620	+++	+++	+++	+			
Hámster	BHKT7	+	+++	+++	+++	+++		
Humano	U2OS	++++	++	++++	++++			
Mono	Vero	+++	++++	+++	++++			

20 **Ejemplo 5**

**Rhabdovirus quiméricos**

Un problema potencial con composiciones virales oncolíticas es el potencial de una respuesta inmune en un paciente. Dicha respuesta inmune puede mitigar la eficacia de aplicaciones adicionales de virus oncolítico ya que una parte significativa del virus aplicado puede neutralizarse por el sistema inmune del paciente. Para evitar este problema sería preferible tener una pluralidad de composiciones virales oncolíticas que sean inmunológicamente distintas. En este caso puede aplicarse un virus oncolítico diferente a un paciente para cada terapia posterior proporcionando de ese modo actividad oncolítica sostenida que está mínimamente afectada por la respuesta inmune

25

de un hospedador. Para este fin, se construyeron varias composiciones virales pseudotipadas y se ensayaron para su capacidad de infectar células.

Para estudiar la posibilidad de usar rhabdovirus oncolíticos que comprendan diversas proteínas G de rhabdovirus se construyeron diversos virus recombinantes. Cada recombinante incluía la estructura tipo silvestre de VSV Indiana (genes N, P, M y L) salvo que se especifique de otro modo. Además, los recombinantes incluían un gen indicador de luciferasa, de luciérnaga (FL) o Renilla (RL) entre el gen G y el L. La nomenclatura general usada para hacer referencia a los recombinantes es RVR<sub>a</sub>G<sup>x</sup>, donde RVR significa Rhabdovirus recombinante, (a) indica el origen de la proteína G o gen tipo proteína G y (x) indica el número de versión.

**RVR con proteína G de Isfahan.** Se clonó un genoma RVR en el vector pXN2VSV de modo que sitios de restricción XhoI y NheI flanquearan los genes G o tipo G. La secuencia de inicio y parada viral se añadió al extremo 3' de todos los genes G o tipo G que codificaba la siguiente secuencia: CTCGAGGGTATGAAAAAACTAACAGATATCACGGC TAG (SEC ID N° 25). El virus recombinante se pseudotipó con la proteína G de Isfahan que tiene una identidad de secuencia proteica del 37 % en comparación con VSV G Ind. El RVR que comprenden el gen indicador FL se denominó RVR<sub>Isf</sub> (Isfahan) G<sup>1</sup> (donde la versión 1 indica la presencia del gen indicador FL).

Además estudios de neutralización con anticuerpos mostraron que suero que comprendía anticuerpos de ratones inmunizados con VSV WT no neutralizaban significativamente la actividad de RVR Isf G<sup>1</sup> *in vitro*.

Además, cuando a ratones inmunizados con VSV-WT se les inyectó RVR<sub>Isf</sub>G<sup>1</sup>, el virus con el polipéptido Isf G es capaz de evadir el sistema inmune. Como se muestra en la FIG. 6C, RVR<sub>Isf</sub>G<sup>1</sup> fue detectable en diversas localizaciones en ratones inmunizados después de inoculación viral. El nivel de RVR<sub>Isf</sub>G<sup>1</sup> detectado en los ratones inmunizados fue similar al nivel detectado en animales de control vírgenes (FIG. 6A). Por otro lado, no se detectó virus en ratones inmunizados que se inocularon con VSV (FIG. 6B). Por tanto, los virus oncolíticos que comprenden el polipéptido Isf G escapan a la respuesta inmune del hospedador contra el VSV administrado previamente *in vivo*.

Estos resultados se confirmaron adicionalmente inyectando tumores en ratones vírgenes inmunizados con VSV o virus recombinante y se determinó la producción de virus de partir de las infecciones. Como se muestra en la FIG. 7, el virus recombinante inyectado en tumores de ratones inmunizados o vírgenes produjo grandes cantidades de virus descendiente. Por otro lado, la propagación de VSV inyectado en ratones inmunizados fue apenas detectable.

También se construyeron dos RVR adicionales que comprenden el Isf. RVR<sub>Isf</sub>G<sup>2</sup> comprende un gen indicador RL en lugar del gen indicador FL de RVR<sub>Isf</sub>G<sup>1</sup>. Además, RVR<sub>Isf</sub>G<sup>3</sup> comprende una proteína quimérica VSV-Isf G. La proteína quimérica (SEC ID N° 19) comprende el ectodominio de G de Isfahan con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de G de VSV.

**RVR con proteína G de Chandipura.** Chandipura G tiene una homología de secuencia proteica del 42 % con VSV G (Indiana). Se usó la misma estrategia de clonación descrita anteriormente para construir RVR<sub>Cha</sub>G<sup>1</sup>. Una curva de crecimiento de una etapa con RVR<sub>Cha</sub>G<sup>1</sup> mostró que produce cantidades similares de virus en comparación con VSV (FIG. 8). Además, el RVR tenía citotoxicidad similar en comparación con VSV (FIG. 9).

**RVR con proteína G de Maraba.** Maraba G tiene una homología de secuencia proteica del 83 % con VSV G (Indiana). Éste es el primer informe de la secuencia de la proteína G de Maraba proporcionada como una secuencia de ADN en la SEC ID N° 20. Se usó la misma estrategia de clonación descrita anteriormente para construir RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup>. Una curva de crecimiento de una etapa con RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup> mostró que el título de virus recombinante era mayor que VSV a las 48 y 72 h. Por tanto, el cambio de proteína G puede estabilizar el virus y potenciar de ese modo la producción (FIG. 10). Además, el RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup> demostró ser citotóxico (FIG. 11). Además, los ensayos de neutralización con anticuerpo mostraron que el suero de ratones inmunizados con VSV WT no neutralizaba la actividad de RVR<sub>Mar</sub>G<sup>1</sup> lo que indica que el RVR tiene capacidad de evasión inmune.

**RVR con proteína G de Muir Springs.** Muir Springs G tiene una homología de secuencia proteica del 25,4 % con VSV G (Indiana). La secuencia de Muir Springs G se proporciona en la SEC ID N° 21 (aminoácidos) y la SEC ID N° 22 (ADN). Se usó la misma estrategia de clonación descrita anteriormente para construir RVR<sub>Mur</sub>G<sup>1</sup>.

**RVR con proteína G de virus Klamath.** Experimentos de pseudotipado confirmaron que la proteína G de Klamath es funcional en un entorno de bajo pH (6,8), a diferencia de VSV G. Esto es de gran importancia ya que se sabe que el núcleo del tumor es hipóxico y ácido. Por tanto, puede ser una ventaja tener un virus que pueda replicarse en dicho entorno. Se generaron VSV HRGFP-Klamath pseudotipados de modo que los viriones contuvieran el genoma de un virus pero las proteínas de envuelta de ambos virus por coinfección en células CT26. A las 24 horas después de la coinfección, se recogió el sobrenadante y se titularon las partículas pseudotipadas. Después se usó el virus pseudotipado (junto con virus de control para infectar células diana en medios de dos tipos diferentes de acidez. Los resultados muestran que la proteína G de Klamath era responsable de la capacidad del virus de infectar a bajo pH.

Se usó esencialmente la misma estrategia de clonación descrita anteriormente para construir RVR<sub>Kla</sub>G<sup>2</sup>. Sin embargo, a diferencia de las estrategias previas, este recombinante incluye Klamath G además de la VSV G original.

(Indiana).

**RVR con proteína G del virus Farmington (Far).** El virus Farmington es un no vesiculovirus que es no neurotrópico y muestra formación de sincitios grandes.

5 **RVR con proteína G del virus Bahía Grande (Bah).** El virus Bahía Grande es un no vesiculovirus que es no neurotrópico.

10 **RVR con proteína Env retroviral JSR.** Como el VSV tiene neurotoxicidad conocida, sería ventajosa una estrategia por la cual un VSV recombinante no infectara neuronas. JSR Env es originalmente del gen de envuelta (Env) no neutrópico del retrovirus JSRV (un virus no neurotrópico). Se genera una quimera que comprende el ectodominio de JSRV Env con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de G de VSV (secuencia de ADN proporcionada como SEC ID N° 23).

15 **RVR con proteína G de Ébola.** Ébola es un virus no neurotrópico con una glucoproteína que funciona uniéndose al receptor y mediando la fusión de membrana. La proteína G contiene un sitio de escisión por furina en la posición del aminoácido 497-501. Los productos de escisión (GP1 y GP2) se ligan mediante enlaces disulfuro y se cree que actúan como posible señuelo para anticuerpos neutralizantes o inmunomoduladores. Sin embargo, el sitio de escisión por furina no es necesario para la infección o tropismo. La secuencia de ADN de la proteína G de Ébola se proporciona como SEC ID N° 24.

20

**Referencias**

25 Patente de Estados Unidos 4.554.101  
 Patente de Estados Unidos 4.683.195  
 Patente de Estados Unidos 4.683.202  
 Patente de Estados Unidos 4.684.611  
 Patente de Estados Unidos 4.800.159  
 Patente de Estados Unidos 4.879.236  
 Patente de Estados Unidos 4.883.750  
 30 Patente de Estados Unidos 4.946.773  
 Patente de Estados Unidos 4.952.500  
 Patente de Estados Unidos 5.220.007  
 Patente de Estados Unidos 5.279.721  
 Patente de Estados Unidos 5.284.760  
 35 Patente de Estados Unidos 5.302.523  
 Patente de Estados Unidos 5.322.783  
 Patente de Estados Unidos 5.354.670  
 Patente de Estados Unidos 5.366.878  
 Patente de Estados Unidos 5.384.253  
 40 Patente de Estados Unidos 5.389.514  
 Patente de Estados Unidos 5.399.363  
 Patente de Estados Unidos 5.464.765  
 Patente de Estados Unidos 5.466.468  
 Patente de Estados Unidos 5.538.877  
 45 Patente de Estados Unidos 5.538.880  
 Patente de Estados Unidos 5.543.158  
 Patente de Estados Unidos 5.550.318  
 Patente de Estados Unidos 5.563.055  
 Patente de Estados Unidos 5.580.859  
 50 Patente de Estados Unidos 5.589.466  
 Patente de Estados Unidos 5.591.616  
 Patente de Estados Unidos 5.610.042  
 Patente de Estados Unidos 5.635.377  
 Patente de Estados Unidos 5.641.515  
 55 Patente de Estados Unidos 5.656.610  
 Patente de Estados Unidos 5.702.932  
 Patente de Estados Unidos 5.736.524  
 Patente de Estados Unidos 5.739.169  
 Patente de Estados Unidos 5.780.448  
 60 Patente de Estados Unidos 5.789.166  
 Patente de Estados Unidos 5.789.215  
 Patente de Estados Unidos 5.798.208  
 Patente de Estados Unidos 5.801.005  
 Patente de Estados Unidos 5.824.311  
 65 Patente de Estados Unidos 5.830.650  
 Patente de Estados Unidos 5.830.880

Patente de Estados Unidos 5.840.873  
 Patente de Estados Unidos 5.843.640  
 Patente de Estados Unidos 5.843.650  
 Patente de Estados Unidos 5.843.651  
 5 Patente de Estados Unidos 5.843.663  
 Patente de Estados Unidos 5.846.225  
 Patente de Estados Unidos 5.846.233  
 Patente de Estados Unidos 5.846.708  
 Patente de Estados Unidos 5.846.709  
 10 Patente de Estados Unidos 5.846.717  
 Patente de Estados Unidos 5.846.726  
 Patente de Estados Unidos 5.846.729  
 Patente de Estados Unidos 5.846.783  
 Patente de Estados Unidos 5.846.945  
 15 Patente de Estados Unidos 5.849.481  
 Patente de Estados Unidos 5.849.483  
 Patente de Estados Unidos 5.849.486  
 Patente de Estados Unidos 5.849.487  
 Patente de Estados Unidos 5.849.497  
 20 Patente de Estados Unidos 5.849.546  
 Patente de Estados Unidos 5.849.547  
 Patente de Estados Unidos 5.851.770  
 Patente de Estados Unidos 5.851.772  
 Patente de Estados Unidos 5.851.772  
 25 Patente de Estados Unidos 5.853.990  
 Patente de Estados Unidos 5.853.992  
 Patente de Estados Unidos 5.853.993  
 Patente de Estados Unidos 5.856.092  
 Patente de Estados Unidos 5.858.652  
 30 Patente de Estados Unidos 5.861.244  
 Patente de Estados Unidos 5.863.732  
 Patente de Estados Unidos 5.863.753  
 Patente de Estados Unidos 5.866.331  
 Patente de Estados Unidos 5.866.337  
 35 Patente de Estados Unidos 5.866.366  
 Patente de Estados Unidos 5.871.986  
 Patente de Estados Unidos 5.882.864  
 Patente de Estados Unidos 5.900.481  
 Patente de Estados Unidos 5.905.024  
 40 Patente de Estados Unidos 5.910.407  
 Patente de Estados Unidos 5.912.124  
 Patente de Estados Unidos 5.912.145  
 Patente de Estados Unidos 5.912.148  
 Patente de Estados Unidos 5.916.776  
 45 Patente de Estados Unidos 5.916.779  
 Patente de Estados Unidos 5.919.626  
 Patente de Estados Unidos 5.919.630  
 Patente de Estados Unidos 5.922.574  
 Patente de Estados Unidos 5.925.517  
 50 Patente de Estados Unidos 5.925.525  
 Patente de Estados Unidos 5.925.565  
 Patente de Estados Unidos 5.928.862  
 Patente de Estados Unidos 5.928.869  
 Patente de Estados Unidos 5.928.870  
 55 Patente de Estados Unidos 5.928.905  
 Patente de Estados Unidos 5.928.906  
 Patente de Estados Unidos 5.929.227  
 Patente de Estados Unidos 5.932.413  
 Patente de Estados Unidos 5.932.451  
 60 Patente de Estados Unidos 5.935.791  
 Patente de Estados Unidos 5.935.819  
 Patente de Estados Unidos 5.935.825  
 Patente de Estados Unidos 5.939.291  
 Patente de Estados Unidos 5.942.391  
 65 Patente de Estados Unidos 5.945.100  
 Patente de Estados Unidos 5.981.274

- Patente de Estados Unidos 5.994.624  
 Abschuetz et al., *Cell Tissue Res.*, 325(3):423-36, 2006.  
 Almendro et al., *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.  
 Angel et al., *Cell*, 49:729, 1987a.  
 5 Angel et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987b.  
 Austin-Ward y Villaseca, *Revista Médica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.  
 Ausubel et al., En: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994.  
 Bajorin et al., *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-792, 1988.  
 Bakhshi et al., *Cell*, 41(3):899-906, 1985.  
 10 Banerji et al., *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.  
 Banerji et al., *Cell*, 33(3):729-740, 1983.  
 Bergmann et al., *Cancer Res.*, 61(22):8188-93, 2001.  
 Berkhout et al., *Cell*, 59:273-282, 1989.  
 Blonar et al., *EMBO J.*, 8:1139, 1989.  
 15 Blood. 2001 Jun 15;97(12):3746-54  
 Bodine y Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.  
 Boshart et al., *Cell*, 41:521, 1985.  
 Bosze et al., *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.  
 Braddock et al., *Cell*, 58:269, 1989.  
 20 Braisted y Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12):5688-5692, 1996.  
 Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.  
 Bulla y Siddiqui, *J. Virology*, 62:1437, 1986.  
 Burton y Barbas, *Adv. Immunol.*, 57:191-280, 1994.  
 Campbell y Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.  
 25 Campere y Tilghman; *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.  
 Campo et al., *Nature*, 303:77, 1983.  
 Carbonelli et al., *FEMSMicrobiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.  
 Celander y Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.  
 Celander et al., *J. Virology*, 62:1314, 1988.  
 30 Chandler et al., *Cell*, 33:489, 1983.  
 Chandler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.  
 Chang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.  
 Chatterjee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.  
 Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.  
 35 Choi et al., *Cell*, 53:519, 1988.  
 Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.  
 Cleary y Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-7443, 1985.  
 Cleary et al., *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.  
 Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.  
 40 Coffey et al., *Science*, 282(5392):1332-4, 1998.  
 Cohen y Wittenauer, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10:176-181, 1987.  
 Costa et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:81-90, 1988.  
 Cripe et al., *EMBO J.*, 6:3745, 1987.  
 Culotta y Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376-1380, 1989.  
 45 Culver et al., *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992,  
 Cunningham et al., *Science*, 244(4908):1081-1085, 1989.  
 Dandolo et al., *J. Virology*, 47:55-64, 1983.  
 Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.  
 de Villiers et al., *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.  
 50 Deschamps et al., *Science*, 230:1174-1177, 1985.  
 Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.  
 Edbrooke et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908-1916, 1989.  
 Edlund et al., *Science*, 230:912-916, 1985.  
 Solicitud Europea 320 308  
 55 Solicitud Europea 329 822  
 Fehcheimer, et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.  
 Feng y Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.  
 Firak y Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.  
 Foecking y Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.  
 60 Fraley et al., *Bio/Technology*, 3:629-635, 1985.  
 Frohman, En: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.  
 Fuerst et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 3:8122-8126, 1986.  
 Fuerst et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 3: 8122-26, 1986.  
 Fujita et al., *Cell*, 49:357, 1987.  
 65 Solicitud GB 2 202 328  
 Gilles et al., *Cell*, 33:717, 1983.

- Gloss et al., *EMBO J.*, 6:3735, 1987.  
 Godbout et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.  
 Goodbourn y Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.  
 Goodbourn et al., *Cell*, 45:601, 1986.  
 5 Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.  
 Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.  
 Greene et al., *Immunology Today*, 10:272, 1989.  
 Gromeier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(12):6803-8, 2000.  
 Grosschedl y Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.  
 10 Grote et al., *Blood.*, 97(12):3746-54, 2001.  
 Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.  
 Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.  
 Haslinger y Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.  
 Hauber y Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.  
 15 Heise et al., *Nat. Med.*, 6(10):1134-9, 2000.  
 Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.  
 Hen et al., *Nature*, 321:249, 1986.  
 Hensel et al., *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.  
 Herr y Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.  
 20 Hilton et al., *J. Biol. Chem.*, 271 (9):4699-4708, 1996.  
 Hirochika et al., *J. Virol.*, 61:2599, 1987.  
 Hirsch et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.  
 Holbrook et al., *Virology*, 157:211, 1987.  
 Holden et al., *EMBO J.*, 6:1565-1570, 1987.  
 25 Horlick y Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.  
 Huang et al., *Cell*, 27:245, 1981.  
 Hug et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065-3079, 1988.  
 Hui y Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.  
 Hwang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.  
 30 Imagawa et al., *Cell*, 51:251, 1987.  
 Imbra y Karin, *Nature*, 323:555, 1986.  
 Imler et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.  
 Imperiale y Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.  
 Innis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.  
 35 Irie y Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(22):8694-8698, 1986.  
 Irie et al., *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.  
 Jakobovits et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.  
 Jameel y Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.  
 Jaynes et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.  
 40 Johnson et al., *Amer. J. Physiol.*, 256:H1012-1022, 1989.  
 Ju et al., *Gene Ther.*, 7(19):1672-1679, 2000.  
 Kadesch y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.  
 Kaepler et al., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.  
 Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.  
 45 Karin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.  
 Katinka et al., *Cell*, 20:393, 1980.  
 Katinka et al., *Nature*, 290:720, 1981.  
 Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.  
 Kawamoto et al., *Mol. Cell Biol.*, 8:267, 1988.  
 50 Kerschner et al., *J. Gen. Virol.*, 67 (Pt 6):1081-9, 1986.  
 Kiledjian et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.  
 Kinoh et al., *Gene Ther.*, 11(14):1137-45, 2004.  
 Klamut et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.  
 Koch et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.  
 55 Kraus et al. *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.  
 Kriegler y Botchan, En: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.  
 Kriegler y Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983. Kriegler et al., *Cell*, 38:483, 1984. Kriegler et al., *Cell*, 53:45, 1988.  
 60 Kriegler et al., En: *Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes*, Van de Woude et al. eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.  
 Kriegler et al., En: *Gene Expression*, Alan Liss (Ed.), Hamer and Rosenberg, Nueva York, 1983.  
 Kuhl et al., *Cell*, 50:1057, 1987.  
 Kunz et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.  
 65 Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.  
 Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

- Lareyre et al., *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.  
 Larsen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.  
 Laspia et al., *Cell*, 59:283, 1989.  
 Latimer et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.  
 5 Lee et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238(2):462-467, 1997.  
 Lee et al., *Nature*, 294:228, 1981.  
 Lee et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.  
 Levenson et al., *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.  
 Levinson et al., *Nature*, 295:79, 1982.  
 10 Lin et al., *Cytogenet. Cell Genet.* 53:169-171, 1990.  
 Logg et al., *Hum. Gene Ther.*, 12(8):921-32, 2001.  
 Luria et al., *EMBO J.*, 6:3307, 1987.  
 Lusky y Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.  
 Lusky et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.  
 15 Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.  
 Majors y Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:5866, 1983.  
 McNeall et al., *Gene*, 76:81, 1989.  
 Miksicek et al., *Cell*, 46:203, 1986.  
 Mineta et al., *Nat. Med.*, 1(9):938-43, 1995.  
 20 Mitchell et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.  
 Mitchell et al., *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869., 1990.  
 Mordacq y Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.  
 Moreau et al., *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.  
 Morton et al., *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992.  
 25 Muesing et al., *Cell*, 48:691, 1987.  
 Muir Springs and Bahia Grande: *J Gen Virol.* 1986 Jun;67 (Pt 6):1081-9  
 Ng et al., *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.  
 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.  
 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.  
 30 Nomoto et al., *Gene*, 236(2):259-271; 1999.  
 Ohara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.  
 Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.  
 Omizt et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:3466, 1987.  
*Oncol Res.* 1999;11(3):133-44.  
 35 Ondek et al., *EMBO J.*, 6:1017, 1987.  
 Palmiter et al., *Cell*, 29:701, 1982.  
 Palmiter et al., *Nature*, 300:611, 1982.  
 Solicitud PCT PCT/US87/00880  
 Solicitud PCT PCT/US89/01025  
 40 Solicitud PCT WO 88/10315  
 Solicitud PCT WO 89/06700  
 Solicitud PCT WO 90/07641  
 Solicitud PCT WO 94/09699  
 Solicitud PCT WO 95/06128  
 45 Pech et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.  
 Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.  
 Perez-Stable y Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.  
 Picard y Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.  
 Pietras et al., *Oncogene*, 17(17):2235-2249, 1998.  
 50 Pinkert et al., *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.  
 Ponta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82:1020, 1985.  
 Porton et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.  
 Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.  
 Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998. Queen y Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.  
 55 Quinn et al., *Mol. Cell Biol.*, 9:4713, 1989.  
 Ravindranath aynd Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.  
 Redondo et al., *Science*, 247:1225, 1990.  
 Reisman y Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.  
 Remington's *Pharmaceutical Sciences*" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580, 1990.  
 60 Resendez Jr. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.  
 Rippe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9(5):2224-2227, 1989.  
 Rittling et al., *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.  
 Rodriguez et al. (1990) *J. Virol.*, 64:4851-4857, 1990.  
 Rodriguez et al., *J. Virol.*, 64:4851-4857, 1990.  
 65 Rosen et al., *Cell*, 41:813, 1988.  
 Rosenberg et al., *Ann. Surg.*, 210(4):474-548, 1989.

- Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.  
 Sakai et al., *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.  
 Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.  
 Satake et al., *J. Virology*, 62:970, 1988.  
 5 Schaffner et al., *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.  
 Searle et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.  
 Shafren et al., *Clin. Cancer Res.*, 10(1 Pt 1): 53-60, 2004.  
 Sharp y Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.  
 Shaul y Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.  
 10 Sherman et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.  
 Sinkovics y Horvath, *J. Clin. Virol.*, 16(1):1-15, 2000.  
 Sleight y Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.  
 Spalholz et al., *Cell*, 42:183, 1985.  
 Spandau y Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.  
 15 Spandidos y Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.  
 Stephens y Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.  
 Stillman et al., *J. Virol.*, 69: 2946-53, 1995.  
 Stillman et al., *J. Virol.*, 69:2946-2953, 1995.  
 Stojdl et al., *Cancer Cell.*, 4(4):263-75, 2003.  
 20 Stojdl et al., *Nat Med.*, 6(7):821-5, 2000.  
 Stuart et al., *Nature*, 317:828, 1985.  
 Sullivan y Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.  
 Swartzendruber y Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.  
 Takada et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997.  
 25 Takada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997.  
 Takebe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.  
 Tavernier et al., *Nature*, 301:634, 1983.  
 Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.  
 Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.  
 30 Taylor et al., *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.  
 Thiesen et al., *J. Virology*, 62:614, 1988.  
 Timiryasova et al., *Oncol. Res.*, 11(3):133-44, 1999.  
 Treisman, *Cell*, 46(4):567-174, 1986  
 Tronche et al., *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.  
 35 Tronche et al., *Mol. Cell Biol.*, 9(11):4759-4766, 1989.  
 Trudel y Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.  
 Tsujimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.  
 Tsujimoto et al., *Nature*, 315:340-343, 1985.  
 Tsumaki et al., *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-22864, 1998.  
 40 Unno et al., *Clin. Cancer Res.*, 11(12):4553-60, 2005.  
 Usdin et al., (1993) *BioTechniques*, 14:222-224, 1993.  
 Usdin et al., *Bio. Techniques.*, 14:222-224, 1993.  
 Vannice y Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.  
 Vasseur et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77:1068, 1980.  
 45 Walker et al., *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-1696, 1992.  
 Wang y Calame, *Cell*, 47:241, 1986.  
 Warren et al., *Biochemistry*, 35(27):8855-8862, 1996.  
 Weber et al., *Cell*, 36:983, 1984.  
 Weinberger et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.  
 50 Wells et al., *J. Leukoc. Biol.*, 59(1):53-60, 1996.  
 Winoto y Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.  
 Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.  
 Wu et al., *J. Exp. Med.*, 185:1-681-1691, 1997.  
 Yelton et al., *J. Immunol.*, 155(4):1994-2004, 1995.  
 55 Yutzey et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397-1405, 1989.  
 Zeng et al., *Biochemistry*, 35(40):13157-13164, 1996.  
 Zhao-Emonet et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> STOJDL, DAVID  
 BROWN, CHRISTOPHER  
 BELL, JOHN  
 65 <120> RHABDOVIRUS ONCOLÍTICO

ES 2 551 892 T3

<130> FUL-338 EP  
 <140> 07 875 168.2  
 <141> 17-09-2007  
 5  
 <150> 60/844.726  
 <151> 15-09-2006  
 10  
 <160> 28  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 11068  
 15  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Virus Maraba  
 20  
 <400> 1

ctgttacagt caagagagtc attgatgatt cactcatcac ccccaaattg cctgcgaatg 60  
 aggaccctgt ggagtaccct gctgattatt tcaaaaagtc ccgtgatatt ccggtgtaca 120  
 taaacacgac caaaagttg tctgattgc ggggctatgt ttatcaaggc ctaaagtcag 180  
 gcaacatctc tataattcat gtcaacagtt atctgtatgc agcattaaaa gagatcagag 240  
 gaaaattgga cagagattgg atcaccttgg gtatccaaat cggaaaaaca ggagatagcg 300  
 tggggatatt cgatttactg accctaaaac ctctagatgg tgtttacca gatgggggtg 360  
 ctgatgctac tcgaactagc tcagacgatg catggcttcc actgtatcta ttggggttat 420  
 acagagttgg tcgaacacag atgccagaat acaggaagaa gctgatggat ggtctgatta 480  
 atcaatgtaa gatgatcaat gagcagttg aaccactggt gccagaagga agagatgtct 540  
 ttgatgtctg gggaaatgac agcaattaca caaagattgt ggccgctgta gatatgttct 600  
 tccatagtgt caaaaagcat gagaaggcct ctttcaggta tggcacaata gtgtcaagat 660  
 ttaaggattg tgcagcattg gctacatttg gtcactctgt taagatcact ggtatgtcca 720  
 ctgaagatgt gacaacttgg attctaaaca gggaggtggc tgatgagatg gttcaaataga 780  
 tgtaccagg acaggagata gataaggctg attcttcat gccttatcta atcgacttag 840

gtctgtctc aaaatctcca tatccatcag ttaaaaatcc agctttccat ttttggggtc 900  
 aattgaccgc attgttactg agatcaacca gagccagaaa tgcacgtcag ccgatgaca 960  
 tcgagtatac atccctgacc actgctgggc tgttgtatgc atatgccgtt ggttcgtctg 1020  
 cagacctggc tcaacaattc tacgttgggg acaacaagta tgtgccagaa actggagatg 1080  
 gaggattaac caccaatgca ccgccacaag ggcgagatgt ggtcagatgg cttagttggt 1140  
 ttgaagatca aaacagaaaa cctaccccag acatgctcat gtatgctaag agagctgtca 1200  
 gtgctttaca aggattgagg gagaagacga ttggcaagta cgccaagtca gagtttgaca 1260  
 aatgacaact cactcaccat atgtattact acctttgctt catatgaaaa aaactaacag 1320  
 cgatcatgga tcagctatca aaggtaagg aattccttaa gacttacgag cagttggatc 1380  
 aagcagtaca agagatggat gacattgagt ctacagagaga ggaaaagact aattttgatt 1440  
 tgtttcagga agaaggattg gagattaagg agaagccttc ctattatcgg gcagatgaag 1500  
 aagagattga ttcagatgaa gacagcgtgg atgatgcaca agacttaggg atacgtacat 1560  
 caacaagtcc catcgagggg tatgtggatg aggagcagga tgattatgag gatgaggaag 1620  
 tgaacgtggt gtttacctg gactggaaac agcctgagct ggaatccgac ggggatggga 1680  
 aaactctccg attgacgata ccagatggat tgactgggga gcagaagtcg caatggcttg 1740  
 ccacgattaa ggcagttggt cagagtgcta aatattggaa catctcagaa tgttcatttg 1800  
 agagttatga gcaagggggt ttgattagag agagacaaat gactcctgat gtctacaaag 1860  
 tcactcctgt tttaaagtct ccaccgggtc aatgacagc taatcaagat gtttggcttc 1920  
 tcagcagcac tccatttaca ttttgccca agaaacaagg tgtgactcca ttgacctatg 1980  
 ccttagaaga actcttcaac acccgaggtg aattcatatc tctgggaggà aacgggaaaa 2040  
 tgagtcaccg ggaggccatc attctagggg tgagacacaa gaagctctat aatcaagcca 2100  
 gactaaagta taacttagct tgaatatgaa aaaaactaac agatatcaaa agatatctct 2160  
 aactcagtc attgtgttca gttcaatcat gagctctctc aagaaaattt tgggtattaa 2220  
 agggaaaggg aagaaatcta agaaattagg tatggctccc ccaccctatg aagaagagac 2280  
 tccaatggaa tattctcaa gtgcacctta tgataagtca ttgtttggag tcgaagatat 2340  
 ggatttccat gatcaacgtc aactccgata tgagaaattt cacttctcat tgaagatgac 2400  
 tgtgagatca aacaaacctt ttcgaaatta tgatgacgtt gcagcagcgg tgtccaattg 2460  
 ggatcatatg tacatcggca tggcagggaa acgtcctttt tataagatat tagcattcat 2520

gggttctact ctattgaagg ctacaccagc tgtcttggt gaccaaggac agccagaata 2580  
 tcatgctcac tgtgaggac gagcttactt gccgcatcgg ttagggccga cccctccgat 2640  
 gttgaatgct cctgaacatt ttcgccgtcc atttaacatc ggattattca gagggacaat 2700  
 cgacataacc ctggtacttt tcatgatga atctgtagat tctgccccgg tcatatggga 2760  
 tcattttaat gcatccagat tgagcagctt cagagaaaag gctttgttgt ttggtttgat 2820  
 tctagaaaag aaagccactg ggaattgggt attggactct attagtcatt tcaagtaatt 2880  
 atcacaagtg ttgaggtgat gggcagacta tgaaaaaac taacagggtt caaacactct 2940  
 tgatcgaggt acccagttat attgtttaca acaatgttga gacttttct cttttgttc 3000  
 ttggccttag gagcccactc caaatttact atagtattcc ctcatcatca aaaagggat 3060  
 tgaagaatg tgccttcac atatcattat tgccttcta gttctgacca gaattggcat 3120  
 aatgatttga ctggagttag tcttcatgtg aaaattocca aaagtcacaa agctatacaa 3180  
 gcagatggct ggatgtgcca cgctgctaaa tgggtgacta cttgtgactt cagatggtag 3240  
 ggacccaaat acatcacgca ttccatacac tctatgtcac ccaccctaga acagtgaag 3300  
 accagtattg agcagacaaa gcaaggagtt tggattaatc caggctttcc cctcaaagc 3360  
 tgcggatag ctacagtac ggatgcagag gtggttgtt tacaagcaac acctcatcat 3420  
 gtgttggtg atgagtacac aggagaatgg attgactcac aattggtggg gggcaaatgt 3480  
 tccaaggagg tttgtcaaac ggttcacaac tgcaccgtgt ggcattgctga ttacaagatt 3540  
 acagggctgt gcgagtcaaa tctggcatca gtggatatca cttcttctc tgaggatggt 3600  
 caaagacgt cttgggaaa accgaact ggattcagga gtaattactt tgcttacgaa 3660  
 agtggagaga aggcattgcc tatgcagtac tgacacaaat ggggatccg actaccttct 3720  
 ggagtatggt ttgaattagt ggacaaagat ctctccagg cggcaaaatt gcctgaatgt 3780  
 cctagaggat ccagtatctc agctccttct cagacttctg tggatgtag tttgatacaa 3840  
 gacgtagaga ggatcttaga ttacttcta tgccaggaga cgtggagtaa gatagagcc 3900  
 aagcttctg tatctccagt agatctgagt tatctgccc caaaaaatcc agggagcgg 3960  
 ccggccttca ctatcattaa tggcacttg aatatctcg aaacaagata catcagagtt 4020  
 gacataagta atccatcat cctcacatg gtgggaacaa tgagtggaac cagactgag 4080  
 cgtgaattgt ggaatgattg gtatccatg gaagacgtag agattggtcc aatgggggtg 4140  
 ttgaaaactc ccaactggtt caagttccg ctgtacatga ttggcacgg aatgttgat 4200

tccgatctcc acaaatcctc ccaggctcaa gtcttcgaac atccacacgc aaaggacgct 4260  
 gcatcacagc ttctgatga tgagacttta tttttggtg acacaggact atcaaaaaac 4320  
 ccagtagagt tagtagaagg ctggttcagt agctggaaga gcacattggc atcgttcttt 4380  
 ctgattatag gcttggggtg tgcattaatc ttcattcattc gaattattgt tgcgattcgc 4440  
 tataaatata aggggaggaa gacccaaaaa atttacaatg atgtcgagat gactcgattg 4500  
 ggaaataaat aacagatgac gcatgagggt cagatcagat ttacagcgtg agtgtgatat 4560  
 ttaggattat aaaggttctt tcattttaat ttgttacaga ctgtatgaaa aaaactcattc 4620  
 aacagccatc atggatgta acgatttga gttgcatgag gactttgcat tgtctgaaga 4680  
 tgactttgc acttcagaat ttctcaatcc ggaagaccaa atgacatacc tgaatcatgc 4740  
 cgattataat tgaattctc ccttaatcag cgatgatatt gatttctga tcaagaaata 4800  
 taatcatgag caaattccga aaatgtggga tgtaaagaat tgggaggag tgtagagat 4860  
 gttgacagcc tggcaagcca gtccaatttt atctagcact atgcataagt gggtaggaaa 4920  
 gtggctcatg tctgatgac atgacgcaag ccaaggcttc agttttcttc atgaagtgga 4980  
 caaagaagct gatctgacgt ttgaggtggt ggagacattc attagaggat ggggaggtcg 5040  
 agaattgcag tacaagagga aagacacatt tccgactcc ttagagttg cagcctcatt 5100  
 gtgtcaaaaa ttcttgatt tgcacaaact cactctgata atgaattcag tctctgaagt 5160  
 cgaacttacc aacctagcaa agaatttaa aggaaaaaac aggaaagcaa aaagcggaaa 5220  
 tctgataacc agattgaggg ttcccagttt aggtcctgct tttgtgactc agggatgggt 5280  
 gtacatgaag aagttgaaa tgattatgga tcggaatttt ttgtgatgt tgaaagacgt 5340  
 tatcatcggg aggatgcaga cgatcctgtc catgatctca agagatgata atctctctc 5400  
 cgagtctgat atctttactg tattaaagat ataccgata ggggataaga tattagaag 5460  
 gcaagggaca aagggttacg acttgatcaa aatgattgag cctatttga acttaaagat 5520  
 gatgaatctg gcacgtaa atcgtcctct catcctaca tttctcatt ttgaaaaaca 5580  
 tattgctgac tctgtaagg aaggatcgaa aatagacaaa gggattgagt ttatatatga 5640  
 tcacattatg tcaatcctg gtgtggactt gaccttagtt atttacggat catttcggca 5700  
 ctggggtcat cctttatca actactatga gggcttagag aagctacaca agcaggttac 5760  
 aatgcccaag actattgaca gagaatatgc agaatgtctt gctagtgatc tggcaagaat 5820  
 cgttctcag caacaattca atgaacataa gaaatggttt gttgatgtag ataaagtccc 5880

acaatcccat cctttcaaaa gccatatgaa agagaatact tggcctactg cagcccaagt 5940  
 tcaggattac ggcgatcgct ggcacagct cccactcatc aatgcttcg aatcccaga 6000  
 tttgttagat ccatgatca tctactcaga caaaagtcac tccatgaacc ggtctgaagt 6060  
 actacgacat gtaagactta cacctcatgt gccattcca agcaggaaag tattgcagac 6120  
 aatgttgag actaaggcaa cagactggaa agagtttta aagaaaattg acgaagaggg 6180  
 gttagaggat gatgatcttg tcataggact caaagggaaa gagagagaat taaaaattgc 6240  
 ggaagattc ttttcttga tgtcctggaa gctcagagag tattttgtca tcactgagta 6300  
 tttgattaag acgcacttg tccgatgtt taaaggggtg accatggcgg atgacttgac 6360  
 agcggtgata aagaagatga tggacacatc tcaggacaa ggcttagata attatgaatc 6420  
 catttgata gccaacata ttgactatga gaagtggaa aatcatcaaa gaaaagagtc 6480  
 gaacgggccc gtgtcaagg tgatgggtca attcttggga tatccacgtc tgattgagag 6540  
 aactcatgaa tttttgaga agagtctgat atattacaat ggacgaccag atctgatgag 6600  
 ggttcagga aattctctag tcaacgcctc atctttaa atgtctgtggg agggcgaagc 6660  
 tgggggatta gaaggactgc gacagaaggg atggagtatt ctaaatttgc ttgtcattca 6720  
 gagagaagca aaaataagga acaccgccgt gaaagtgcta gctcaagggtg acaatcaggt 6780  
 gatatgtact cagtataaaa cgaagaaatc ccggaatgat attgagctta aggcagctct 6840  
 aacacagatg gtatctaata atgagatgat tatgtctgag attaatcag gcaccgagaa 6900  
 actgggtctt ttgattaatg atgatgagac aatgcaatct gctgattacc tcaattacgg 6960  
 gaaggttccc attttcagag gagtaatcag aggccttgag acaaaaagat ggtaacgcgt 7020  
 gacctgtgtg acaaatgatc agattccaac gtgtgcgaac attatgagct ctgtgtcaac 7080  
 taatgcatta actgtagccc attttgcga gaatccagtc aatgcatca ttcagtataa 7140  
 ctactttgga acatttgcaa ggctactgct gatgatgcat gaccccgctc tgaggatctc 7200  
 tctgtatgaa gtccaatcaa aaattccagg acttcacagt ttgacattta aatattctat 7260  
 gttgtatctg gatccttoga taggaggagt ctccggaatg tcaactctga gattctcat 7320  
 aagatcattt ccagatccag tgacagaaag tttggcgttc tggaaattta tccactctca 7380  
 tgcaagaagc gattcattaa aggagatag tgacgtttt ggaaatctg aaattgcaag 7440  
 atttcggcta actcatgctg ataaattggt ggaagaccca acctcattga acatagctat 7500  
 ggaatgagc cctgctaact tattaagac agaggtaaaa aatgtctac tggaaatcaag 7560

gcagagcatc aagaaccaga ttgtaagaga tgctactatt tacctacacc atgaggaaga 7620  
 caaacttcgt agtttcttat ggtccataac accactgttc cctcggttct tgagtgaatt 7680  
 caaatctggg acattcatcg gagtagcaga tggcctgac agcttattc agaactctag 7740  
 gactattcga aattcttta aaaagcgta tcacagggaa cttgatgatt taataatcaa 7800  
 gagcgaagtt tctcactta tgcatttggg taagctacat ttgaggcgag gctcagttcg 7860  
 tatgtggact tgctcttcta ctcaggctga tcttctccga ttccggtcac ggggaagatc 7920  
 tgttatagga accacagtcc ctcatccctt agagatgta ggacaacatt ttaaaaagga 7980  
 gactcctgc agtgcttga acatatccgg attagactat gtatctgtcc actgtccgaa 8040  
 tgggattcat gacgttttg aatcacgtgg tccactccct gcatatttg gttctaaaac 8100  
 atccgaatca acttcgatct tgcagccgtg ggagagagag agtaaagtac cgttgattaa 8160  
 gcgtgccaca aggcttcgtg atgcaattc atggtttgtg tctcccgact ctaactggc 8220  
 ctcaactatc ctaagaaca taaatgcatt aacaggagaa gaatggtaa agaagcagca 8280  
 tggatttaa aggacgggat cggcgttaca caggttctcc acatccagga tgagtcaggg 8340  
 tggttttgct tctcagagta cggctgcctt gactagattg atggcaacta ctgacactat 8400  
 gagagatctg ggagaacaga actatgattt cctgtttcag gcgacattat tgotatgctca 8460  
 aataaccaca actgtagtca ggaatggatc atttcatagc tgcacggacc attaccatat 8520  
 aacctgcaa tctgtctga gggccattga tgagattacc ttggattcag cgatggaata 8580  
 tagccctcca gatgtatcat cagttttaca atcttgagg aatggagaag gctcttgggg 8640  
 acatgaagtg aaacaaat acccagttga aggtgactgg aggggactat ctctgttga 8700  
 acaatcttat caagtcggac gctgtatcgg gtttctgttc ggtgatctgg cgtatagaaa 8760  
 atcatcccat gcagatgata gctccatggt tccgttatct atacaaaaca aagtcagagg 8820  
 aagaggcttt ttaaagggc ttatggatgg gtaaatgaga gccagttggt gccaggtgat 8880  
 ccatcgtcga agcttagccc atctgaagag accggcta at gcagtctatg gagggctgat 8940  
 ttattgata gacaaattga gtgcatctgc ccttttctt tcaactgacga gacatggacc 9000  
 ttaagggaa gaattagaaa ctgttcaca taagataccg acttcttacc ctacgagcaa 9060  
 ccgagatatg ggggtgatag ttcgtaatta tttaaataat cagtcagac tggtagaaaa 9120  
 aggtcggtag aagacacatt atcctcaatt gtggcttttc tcagatgtgc tgtccattga 9180  
 ttcttagga ccctgtcta tatctcaac tctattgggt attctgtata aacagacgtt 9240

atcttctcga gacaaaaatg agttgagaga actcgcctaac ttgtcttcat tgttgagatc 9300  
 aggagaagga tgggaagata tccatgtcaa attcttctct aaggacactt tactctgccc 9360  
 tgaagagatc cgacatgcgt gcaaatttgg gattgctaag gaatccgctg tttaagcta 9420  
 ttatctctct tggctcaag agtcttatgg aggcacacc tcgatccccg tatatttttc 9480  
 gaccaggaag tatcccaaaa ttttagatgt cctcctcgg gttcaaaacc cattggctc 9540  
 gggctacga ttggggcaac tcctactgg agcacattat aagattagga gcattgtaa 9600  
 gaacaagaac cttcgttata gagatttct tagttgtgg gatggatctg gggggatgac 9660  
 cgcggcacta ttgagagaaa acagacaaa taggggaatc ttcaacagcc tgttagagtt 9720  
 agccgatct cttatgagag gagcatctcc agagcctca agtgcactgg agacgctcgg 9780  
 gcaagaacga tctaggtgtg tgaatggaag cacatgttgg gagtactcat ctgacctaa 9840  
 ccaaaaagag acatgggatt acttcttaag attgaagaga ggcctgggtt tgacctgga 9900  
 ctaatcacc atggacatgg agtcagaga cctaataca agttgatga tagaaaagaa 9960  
 cctcaaagt tatctgcatc agatattaga accaactggt gtcttaatat ataaaacata 10020  
 cgggacccat attgcgacac aaacagataa tatctgacg ataatcggtc cttctttga 10080  
 gaggttgac ctagtccagt cgaatacag cagctcaca acgtccgagg tctattttgt 10140  
 aggacgaggc ttgcgctctc atgttgaca acctgggtg gactggccat cctaatgga 10200  
 caattggaga tccatttatg ctttcatga tctactaca gaattatca gagcaaaaaa 10260  
 agtcttgaa attgacagtc ttataggcat tccggctcaa tcattccag acccattgt 10320  
 aatctcgag accatgctac agatagttgg tgtccaaca ggagtttcgc atgccgcagc 10380  
 tctattatca tcacaatc caaatcaatt ggtcacaacg tcaatattt atatgacact 10440  
 cgtgtcttat tataatgtaa accatattcg aagaagcccc aagccttct ctctccgctc 10500  
 tgatggagtc tcacagaaca ttggttcagc catagtcgga ctaagtttt gggtgagttt 10560  
 gatggagaat gatctcggat tatacaaca ggctctaggt gcaataaaga cgtcattccc 10620  
 tattagatgg tctctgtcc agaccaagga tgggttaca caagaatgga gaactaaagg 10680  
 aaacggaatt cctaaagatt gtcgtctctc agactcttg gctcagatag gaaactggat 10740  
 cagagcgatg gaattggfta ggaacaaaac gaggcaatca ggattttctg aaacctatt 10800  
 tgatcaattc tgcggactg cagaccatca cctcaaatgg cggaagttgg gaaacagaac 10860  
 aggaattatt gattggctaa ataatagaat tcatccatt gacaaatcca tcttgggtgac 10920

ES 2 551 892 T3

caaaagtgat ctgcatgacg agaactcatg gagggagtga agatgtattc ttccacctct 10980

cattgggtga tacccatata tgaaaaaac tataagtact ttaaactctc tttgtttttt 11040

aatgtatatc tggttttggt gtttcctg 11068

- <210> 2
- <211> 422
- 5 <212> PRT
- <213> Desconocido
  
- <220>
- <223> Virus Maraba
  
- 10 <400> 2

Met Ser Val Thr Val Lys Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Ile Thr Pro  
1 5 10 15

Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala Asp Tyr Phe  
20 25 30

Lys Lys Ser Arg Asp Ile Pro Val Tyr Ile Asn Thr Thr Lys Ser Leu  
35 40 45

Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Asn Ile  
50 55 60

Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr Ala Ala Leu Lys Glu Ile  
65 70 75 80

Arg Gly Lys Leu Asp Arg Asp Trp Ile Thr Phe Gly Ile Gln Ile Gly  
85 90 95

Lys Thr Gly Asp Ser Val Gly Ile Phe Asp Leu Leu Thr Leu Lys Pro  
100 105 110

Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp Gly Val Ser Asp Ala Thr Arg Thr Ser  
115 120 125

Ser Asp Asp Ala Trp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val  
130 135 140

Gly Arg Thr Gln Met Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu  
145 150 155 160

ES 2 551 892 T3

Ile Asn Gln Cys Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Leu Pro  
165 170 175

Glu Gly Arg Asp Val Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr  
180 185 190

Lys Ile Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His  
195 200 205

Glu Lys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp  
210 215 220

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly Met  
225 230 235 240

Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val Ala Asp  
245 250 255

Glu Met Val Gln Met Met Tyr Pro Gly Gln Glu Ile Asp Lys Ala Asp  
260 265 270

Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Leu Gly Leu Ser Ser Lys Ser Pro  
275 280 285

Tyr Pro Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe Trp Gly Gln Leu Thr  
290 295 300

Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg Asn Ala Arg Gln Pro Asp  
305 310 315 320

Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr  
325 330 335

Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu Ala Gln Gln Phe Tyr Val Gly Asp  
340 345 350

Asn Lys Tyr Val Pro Glu Thr Gly Asp Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala  
355 360 365

Pro Pro Gln Gly Arg Asp Val Val Glu Trp Leu Ser Trp Phe Glu Asp  
370 375 380

ES 2 551 892 T3

Gln Asn Arg Lys Pro Thr Pro Asp Met Leu Met Tyr Ala Lys Arg Ala  
385 390 395 400

Val Ser Ala Leu Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala  
405 410 415

Lys Ser Glu Phe Asp Lys  
420

5 <210> 3  
<211> 265  
<212> PRT  
<213> Desconocido

10 <220>  
<223> Virus Maraba  
<400> 3

Met Asp Gln Leu Ser Lys Val Lys Glu Phe Leu Lys Thr Tyr Ala Gln  
1 5 10 15

Leu Asp Gln Ala Val Gln Glu Met Asp Asp Ile Glu Ser Gln Arg Glu  
20 25 30

Glu Lys Thr Asn Phe Asp Leu Phe Gln Glu Glu Gly Leu Glu Ile Lys  
35 40 45

Glu Lys Pro Ser Tyr Tyr Arg Ala Asp Glu Glu Glu Ile Asp Ser Asp  
50 55 60

Glu Asp Ser Val Asp Asp Ala Gln Asp Leu Gly Ile Arg Thr Ser Thr  
65 70 75 80

Ser Pro Ile Glu Gly Tyr Val Asp Glu Glu Gln Asp Asp Tyr Glu Asp  
85 90 95

Glu Glu Val Asn Val Val Phe Thr Ser Asp Trp Lys Gln Pro Glu Leu  
100 105 110

Glu Ser Asp Gly Asp Gly Lys Thr Leu Arg Leu Thr Ile Pro Asp Gly  
115 120 125

Leu Thr Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ala Thr Ile Lys Ala Val  
 130 135 140

Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Ile Ser Glu Cys Ser Phe Glu Ser  
 145 150 155 160

Tyr Glu Gln Gly Val Leu Ile Arg Glu Arg Gln Met Thr Pro Asp Val  
 165 170 175

Tyr Lys Val Thr Pro Val Leu Asn Ala Pro Pro Val Gln Met Thr Ala  
 180 185 190

Asn Gln Asp Val Trp Ser Leu Ser Ser Thr Pro Phe Thr Phe Leu Pro  
 195 200 205

Lys Lys Gln Gly Val Thr Pro Leu Thr Met Ser Leu Glu Glu Leu Phe  
 210 215 220

Asn Thr Arg Gly Glu Phe Ile Ser Leu Gly Gly Asn Gly Lys Met Ser  
 225 230 235 240

His Arg Glu Ala Ile Ile Leu Gly Leu Arg His Lys Lys Leu Tyr Asn  
 245 250 255

Gln Ala Arg Leu Lys Tyr Asn Leu Ala  
 260 265

<210> 4  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <223> Virus Maraba

10

<400> 4

Met Ser Ser Leu Lys Lys Ile Leu Gly Ile Lys Gly Lys Gly Lys Lys  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Leu Gly Met Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Glu Thr Pro  
 20 25 30

Met Glu Tyr Ser Pro Ser Ala Pro Tyr Asp Lys Ser Leu Phe Gly Val  
 35 40 45

ES 2 551 892 T3

Glu Asp Met Asp Phe His Asp Gln Arg Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe  
50 55 60

His Phe Ser Leu Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Lys Pro Phe Arg Asn  
65 70 75 80

Tyr Asp Asp Val Ala Ala Ala Val Ser Asn Trp Asp His Met Tyr Ile  
85 90 95

Gly Met Ala Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Met Gly  
100 105 110

Ser Thr Leu Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln  
115 120 125

Pro Glu Tyr His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg  
130 135 140

Leu Gly Pro Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg  
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Leu Phe Arg Gly Thr Ile Asp Ile Thr Leu Val  
165 170 175

Leu Phe Asp Asp Glu Ser Val Asp Ser Ala Pro Val Ile Trp Asp His  
180 185 190

Phe Asn Ala Ser Arg Leu Ser Ser Phe Arg Glu Lys Ala Leu Leu Phe  
195 200 205

Gly Leu Ile Leu Glu Lys Lys Ala Thr Gly Asn Trp Val Leu Asp Ser  
210 215 220

Ile Ser His Phe Lys  
225

- <210> 5
- <211> 512
- 5 <212> PRT
- <213> Desconocido
  
- <220>
- <223> Virus Maraba
  
- 10 <400> 5

ES 2 551 892 T3

Met Leu Arg Leu Phe Leu Phe Cys Phe Leu Ala Leu Gly Ala His Ser  
1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His His Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn  
20 25 30

Val Pro Ser Thr Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn Trp  
35 40 45

His Asn Asp Leu Thr Gly Val Ser Leu His Val Lys Ile Pro Lys Ser  
50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys Trp  
65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His  
85 90 95

Ser Ile His Ser Met Ser Pro Thr Leu Glu Gln Cys Lys Thr Ser Ile  
100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Val Trp Ile Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln  
115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Val Val Val Val Gln  
130 135 140

Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile  
145 150 155 160

Asp Ser Gln Leu Val Gly Gly Lys Cys Ser Lys Glu Val Cys Gln Thr  
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Val Trp His Ala Asp Tyr Lys Ile Thr Gly Leu  
180 185 190

Cys Glu Ser Asn Leu Ala Ser Val Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp  
195 200 205

ES 2 551 892 T3

Gly Gln Lys Thr Ser Leu Gly Lys Pro Asn Thr Gly Phe Arg Ser Asn  
210 215 220

Tyr Phe Ala Tyr Glu Ser Gly Glu Lys Ala Cys Arg Met Gln Tyr Cys  
225 230 235 240

Thr Gln Trp Gly Ile Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Leu Val  
245 250 255

Asp Lys Asp Leu Phe Gln Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Arg Gly  
260 265 270

Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile  
275 280 285

Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp  
290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ala Lys Leu Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr  
305 310 315 320

Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Ser Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn  
325 330 335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ser  
340 345 350

Asn Pro Ile Ile Pro His Met Val Gly Thr Met Ser Gly Thr Thr Thr  
355 360 365

Glu Arg Glu Leu Trp Asn Asp Trp Tyr Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile  
370 375 380

Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Pro Thr Gly Phe Lys Phe Pro Leu  
385 390 395 400

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Ser Ser  
405 410 415

Gln Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ala Lys Asp Ala Ala Ser Gln  
420 425 430

ES 2 551 892 T3

Leu Pro Asp Asp Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys  
435 440 445

Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Thr  
450 455 460

Leu Ala Ser Phe Phe Leu Ile Ile Gly Leu Gly Val Ala Leu Ile Phe  
465 470 475 480

Ile Ile Arg Ile Ile Val Ala Ile Arg Tyr Lys Tyr Lys Gly Arg Lys  
485 490 495

Thr Gln Lys Ile Tyr Asn Asp Val Glu Met Ser Arg Leu Gly Asn Lys  
500 505 510

<210> 6  
<211> 2109  
<212> PRT  
<213> Desconocido

5

<220>  
<223> Virus Maraba

10

<400> 6

Met Asp Val Asn Asp Phe Glu Leu His Glu Asp Phe Ala Leu Ser Glu  
1 5 10 15

Asp Asp Phe Val Thr Ser Glu Phe Leu Asn Pro Glu Asp Gln Met Thr  
20 25 30

Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp  
35 40 45

Asp Ile Asp Phe Leu Ile Lys Lys Tyr Asn His Glu Gln Ile Pro Lys  
50 55 60

Met Trp Asp Val Lys Asn Trp Glu Gly Val Leu Glu Met Leu Thr Ala  
65 70 75 80

Trp Gln Ala Ser Pro Ile Leu Ser Ser Thr Met His Lys Trp Val Gly  
85 90 95

Lys Trp Leu Met Ser Asp Asp His Asp Ala Ser Gln Gly Phe Ser Phe  
100 105 110

Leu His Glu Val Asp Lys Glu Ala Asp Leu Thr Phe Glu Val Val Glu  
 115 120 125

Thr Phe Ile Arg Gly Trp Gly Gly Arg Glu Leu Gln Tyr Lys Arg Lys  
 130 135 140

Asp Thr Phe Pro Asp Ser Phe Arg Val Ala Ala Ser Leu Cys Gln Lys  
 145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Met Asn Ser Val Ser Glu  
 165 170 175

Val Glu Leu Thr Asn Leu Ala Lys Asn Phe Lys Gly Lys Asn Arg Lys  
 180 185 190

Ala Lys Ser Gly Asn Leu Ile Thr Arg Leu Arg Val Pro Ser Leu Gly  
 195 200 205

Pro Ala Phe Val Thr Gln Gly Trp Val Tyr Met Lys Lys Leu Glu Met  
 210 215 220

Ile Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Leu Lys Asp Val Ile Ile Gly  
 225 230 235 240

Arg Met Gln Thr Ile Leu Ser Met Ile Ser Arg Asp Asp Asn Leu Phe  
 245 250 255

Ser Glu Ser Asp Ile Phe Thr Val Leu Lys Ile Tyr Arg Ile Gly Asp  
 260 265 270

Lys Ile Leu Glu Arg Gln Gly Thr Lys Gly Tyr Asp Leu Ile Lys Met  
 275 280 285

Ile Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Met Met Asn Leu Ala Arg Lys Tyr  
 290 295 300

Arg Pro Leu Ile Pro Thr Phe Pro His Phe Glu Lys His Ile Ala Asp  
 305 310 315 320

Ser Val Lys Glu Gly Ser Lys Ile Asp Lys Gly Ile Glu Phe Ile Tyr  
 325 330 335

Asp His Ile Met Ser Ile Pro Gly Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr  
 340 345 350

Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asn Tyr Tyr Glu Gly  
 355 360 365

Leu Glu Lys Leu His Lys Gln Val Thr Met Pro Lys Thr Ile Asp Arg  
 370 375 380

Glu Tyr Ala Glu Cys Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Gln  
 385 390 395 400

Gln Gln Phe Asn Glu His Lys Lys Trp Phe Val Asp Val Asp Lys Val  
 405 410 415

Pro Gln Ser His Pro Phe Lys Ser His Met Lys Glu Asn Thr Trp Pro  
 420 425 430

Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Tyr Gly Asp Arg Trp His Gln Leu Pro  
 435 440 445

Leu Ile Lys Cys Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp Pro Ser Ile Ile  
 450 455 460

Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Arg His  
 465 470 475 480

Val Arg Leu Thr Pro His Val Pro Ile Pro Ser Arg Lys Val Leu Gln  
 485 490 495

Thr Met Leu Glu Thr Lys Ala Thr Asp Trp Lys Glu Phe Leu Lys Lys  
 500 505 510

Ile Asp Glu Glu Gly Leu Glu Asp Asp Asp Leu Val Ile Gly Leu Lys  
 515 520 525

Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Ile Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met  
 530 535 540

Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys  
 545 550 555 560

Thr His Phe Val Pro Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu  
 565 570 575

Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Met Asp Thr Ser Ser Gly Gln Gly Leu  
 580 585 590

Asp Asn Tyr Glu Ser Ile Cys Ile Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys  
 595 600 605

Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Phe Lys Val  
 610 615 620

Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Arg Leu Ile Glu Arg Thr His Glu  
 625 630 635 640

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu Met  
 645 650 655

Arg Val Arg Gly Asn Ser Leu Val Asn Ala Ser Ser Leu Asn Val Cys  
 660 665 670

Trp Glu Gly Gln Ala Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp  
 675 680 685

Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn  
 690 695 700

Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr  
 705 710 715 720

Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Asp Ile Glu Leu Lys Ala Ala  
 725 730 735

Leu Thr Gln Met Val Ser Asn Asn Glu Met Ile Met Ser Ala Ile Lys  
 740 745 750

Ser Gly Thr Glu Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met  
 755 760 765

Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Val Pro Ile Phe Arg Gly  
 770 775 780

Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val  
 785                      790                      795                      800

Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met Ser Ser Val Ser  
                     805                      810                      815

Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Glu Asn Pro Val Asn Ala  
                     820                      825                      830

Ile Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe Ala Arg Leu Leu Leu Met  
                     835                      840                      845

Met His Asp Pro Ala Leu Arg Ile Ser Leu Tyr Glu Val Gln Ser Lys  
                     850                      855                      860

Ile Pro Gly Leu His Ser Leu Thr Phe Lys Tyr Ser Met Leu Tyr Leu  
 865                      870                      875                      880

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe Leu  
                     885                      890                      895

Ile Arg Ser Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ala Phe Trp Lys  
                     900                      905                      910

Phe Ile His Ser His Ala Arg Ser Asp Ser Leu Lys Glu Ile Cys Ala  
                     915                      920                      925

Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Arg Phe Arg Leu Thr His Val Asp  
                     930                      935                      940

Lys Leu Val Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ala Met Gly Met Ser  
 945                      950                      955                      960

Pro Ala Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Leu Glu Ser  
                     965                      970                      975

Arg Gln Ser Ile Lys Asn Gln Ile Val Arg Asp Ala Thr Ile Tyr Leu  
                     980                      985                      990

His His Glu Glu Asp Lys Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Thr Pro  
                     995                      1000                      1005

Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Ile  
 1010 1015 1020

Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr  
 1025 1030 1035

Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys Arg Tyr His Arg Glu Leu Asp Asp  
 1040 1045 1050

Leu Ile Ile Lys Ser Glu Val Ser Ser Leu Met His Leu Gly Lys  
 1055 1060 1065

Leu His Leu Arg Arg Gly Ser Val Arg Met Trp Thr Cys Ser Ser  
 1070 1075 1080

Thr Gln Ala Asp Leu Leu Arg Phe Arg Ser Trp Gly Arg Ser Val  
 1085 1090 1095

Ile Gly Thr Thr Val Pro His Pro Leu Glu Met Leu Gly Gln His  
 1100 1105 1110

Phe Lys Lys Glu Thr Pro Cys Ser Ala Cys Asn Ile Ser Gly Leu  
 1115 1120 1125

Asp Tyr Val Ser Val His Cys Pro Asn Gly Ile His Asp Val Phe  
 1130 1135 1140

Glu Ser Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser  
 1145 1150 1155

Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys Val  
 1160 1165 1170

Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp  
 1175 1180 1185

Phe Val Ser Pro Asp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Ile Leu Lys Asn  
 1190 1195 1200

Ile Asn Ala Leu Thr Gly Glu Glu Trp Ser Lys Lys Gln His Gly  
 1205 1210 1215

Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg  
 1220 1225 1230

Met Ser His Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu Thr  
 1235 1240 1245

Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Arg Asp Leu Gly Glu Gln  
 1250 1255 1260

Asn Tyr Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile  
 1265 1270 1275

Thr Thr Thr Val Val Arg Asn Gly Ser Phe His Ser Cys Thr Asp  
 1280 1285 1290

His Tyr His Ile Thr Cys Lys Ser Cys Leu Arg Ala Ile Asp Glu  
 1295 1300 1305

Ile Thr Leu Asp Ser Ala Met Glu Tyr Ser Pro Pro Asp Val Ser  
 1310 1315 1320

Ser Val Leu Gln Ser Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly His  
 1325 1330 1335

Glu Val Lys Gln Ile Tyr Pro Val Glu Gly Asp Trp Arg Gly Leu  
 1340 1345 1350

Ser Pro Val Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe  
 1355 1360 1365

Leu Phe Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Ser His Ala Asp Asp  
 1370 1375 1380

Ser Ser Met Phe Pro Leu Ser Ile Gln Asn Lys Val Arg Gly Arg  
 1385 1390 1395

Gly Phe Leu Lys Gly Leu Met Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser Cys  
 1400 1405 1410

Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Leu Ala His Leu Lys Arg Pro  
 1415 1420 1425

Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys Leu  
 1430 1435 1440

Ser Ala Ser Ala Pro Phe Leu Ser Leu Thr Arg His Gly Pro Leu  
 1445 1450 1455

Arg Glu Glu Leu Glu Thr Val Pro His Lys Ile Pro Thr Ser Tyr  
 1460 1465 1470

Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr Phe  
 1475 1480 1485

Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Val Glu Lys Gly Arg Tyr Lys Thr His  
 1490 1495 1500

Tyr Pro Gln Leu Trp Leu Phe Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp Phe  
 1505 1510 1515

Leu Gly Pro Leu Ser Ile Ser Ser Thr Leu Leu Gly Ile Leu Tyr  
 1520 1525 1530

Lys Gln Thr Leu Ser Ser Arg Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu Leu  
 1535 1540 1545

Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu Asp  
 1550 1555 1560

Ile His Val Lys Phe Phe Ser Lys Asp Thr Leu Leu Cys Pro Glu  
 1565 1570 1575

Glu Ile Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile Ala Lys Glu Ser Ala  
 1580 1585 1590

Val Leu Ser Tyr Tyr Pro Pro Trp Ser Gln Glu Ser Tyr Gly Gly  
 1595 1600 1605

Ile Thr Ser Ile Pro Val Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Tyr Pro Lys  
 1610 1615 1620

Ile Leu Asp Val Pro Pro Arg Val Gln Asn Pro Leu Val Ser Gly  
 1625 1630 1635

Leu Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile Arg  
 1640 1645 1650

Ser Ile Val Lys Asn Lys Asn Leu Arg Tyr Arg Asp Phe Leu Ser  
 1655 1660 1665

Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg Glu  
 1670 1675 1680

Asn Arg Gln Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Ala  
 1685 1690 1695

Gly Ser Leu Met Arg Gly Ala Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala Leu  
 1700 1705 1710

Glu Thr Leu Gly Gln Glu Arg Ser Arg Cys Val Asn Gly Ser Thr  
 1715 1720 1725

Cys Trp Glu Tyr Ser Ser Asp Leu Ser Gln Lys Glu Thr Trp Asp  
 1730 1735 1740

Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Arg Gly Leu Gly Leu Thr Val Asp Leu  
 1745 1750 1755

Ile Thr Met Asp Met Glu Val Arg Asp Pro Asn Thr Ser Leu Met  
 1760 1765 1770

Ile Glu Lys Asn Leu Lys Val Tyr Leu His Gln Ile Leu Glu Pro  
 1775 1780 1785

Thr Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr His Ile Ala Thr  
 1790 1795 1800

Gln Thr Asp Asn Ile Leu Thr Ile Ile Gly Pro Phe Phe Glu Thr  
 1805 1810 1815

Val Asp Leu Val Gln Ser Glu Tyr Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu  
 1820 1825 1830

Val Tyr Phe Val Gly Arg Gly Leu Arg Ser His Val Asp Glu Pro  
 1835 1840 1845

Trp Val Asp Trp Pro Ser Leu Met Asp Asn Trp Arg Ser Ile Tyr  
 1850 1855 1860

Ala Phe His Asp Pro Thr Thr Glu Phe Ile Arg Ala Lys Lys Val  
 1865 1870 1875

Cys Glu Ile Asp Ser Leu Ile Gly Ile Pro Ala Gln Phe Ile Pro  
 1880 1885 1890

Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu Thr Met Leu Gln Ile Val Gly Val  
 1895 1900 1905

Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ser Gln Tyr  
 1910 1915 1920

Pro Asn Gln Leu Val Thr Thr Ser Ile Phe Tyr Met Thr Leu Val  
 1925 1930 1935

Ser Tyr Tyr Asn Val Asn His Ile Arg Arg Ser Pro Lys Pro Phe  
 1940 1945 1950

Ser Pro Pro Ser Asp Gly Val Ser Gln Asn Ile Gly Ser Ala Ile  
 1955 1960 1965

Val Gly Leu Ser Phe Trp Val Ser Leu Met Glu Asn Asp Leu Gly  
 1970 1975 1980

Leu Tyr Lys Gln Ala Leu Gly Ala Ile Lys Thr Ser Phe Pro Ile  
 1985 1990 1995

Arg Trp Ser Ser Val Gln Thr Lys Asp Gly Phe Thr Gln Glu Trp  
 2000 2005 2010

Arg Thr Lys Gly Asn Gly Ile Pro Lys Asp Cys Arg Leu Ser Asp  
 2015 2020 2025

Ser Leu Ala Gln Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ala Met Glu Leu Val  
 2030 2035 2040

Arg Asn Lys Thr Arg Gln Ser Gly Phe Ser Glu Thr Leu Phe Asp  
 2045 2050 2055

Gln Phe Cys Gly Leu Ala Asp His His Leu Lys Trp Arg Lys Leu  
 2060 2065 2070

Gly Asn Arg Thr Gly Ile Ile Asp Trp Leu Asn Asn Arg Ile Ser  
 2075 2080 2085

Ser Ile Asp Lys Ser Ile Leu Val Thr Lys Ser Asp Leu His Asp  
 2090 2095 2100

Glu Asn Ser Trp Arg Glu  
 2105

<210> 7  
 <211> 10716  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Virus Carajas

<400> 7

5

10

cggccggtcg acgctgccta tttacttact gggctttac cgtgttggaa kaacaaaact 60  
 gccggaatac cgaagaagt tgatggaggg gttgaaatg cagtgtaaaa tcatgtatcc 120  
 tgactttgta ccaatcgttc cggaaggaat ggacttcttt gatgtgtggg gaaatgatag 180  
 taatttcacc aaaatagtcg ccgcagtgga tatgttttcc catatgttca aaaagcatga 240  
 gagagcatcc ctcatgatg gaacaattgt ctccagattc aaggattgtg ctgcattggc 300  
 tacatttggc catgtatgta aagtttccgg aatgtccaca gaggagggtca ccacttgggt 360  
 gctgaatagg gaagtggcag acgaattatg ccagatgatg ttcctggac aggaataga 420  
 ccgagcggac tcatacatgc cgtatatgat agatttcggg ttgtctcaga aatcgccata 480  
 ttctctgtc aaaaatccgt ctttccactt ttgggggcaa ctgcagcac tactgctcag 540  
 atcaaccagg gcaaaaaatg ccagacaacc tgatgacatt gaatacacat cactgactac 600  
 agcagggtcta cttcttgcgt atgctgtagg gtcattctga gacatctctc aacagttcta 660  
 catgggagat gagaaatata tctcagacc aagtgcgggt ggattaacct ccaatgcacc 720  
 tccgaaagga aggaatgtag ttgactggct cgggtggttt gaggatcaag gaggaatat 780  
 cactccagat atgtacactt cgctaaaagg gctgtttgct cttgcaagg gctgagagat 840  
 aagaccattg gaaagtatgc caagggagag ttgacaagt gactccattc agatcaaatg 900

cttactaca tgctgtatta tatataacta tgaaaaaac taacagagat catggataat 960  
 ctctcgaac ttaaggagta tatggggact tacacccatc tagactctgc attgcaagat 1020  
 gcaaatgaat cagaagaatc tcgagatgaa aagagcaatt ttgatctttt cgatgaggaa 1080  
 agtaaggagg ttgcaagacc ttcttattat tctgcaattg atgaggagtc tgaccaggag 1140  
 gaaactgaat ccgatgatcc agatgaggag ctgaatgact caaatgccca tggggcgggtg 1200  
 gatggatggg acgagacggt gaacgagaat tctcagcctg acgacaatgt ctctgttgag 1260  
 ttgcctcgt catggtcaac accggtgatg gaatcttcgt cagagggaaa gactttgcat 1320  
 ttggctatgc cagatggact gaatccagat caagtcgcac agtggctgca gactgtcaag 1380  
 gctttgttg agagtgccaa atattggaat ctgtccgaat gcaggatgga agtgcctgctt 1440  
 gagggagtat taatcaaaga gagacaaatg actccagatc ttcagaaggt cacaccgaag 1500  
 ccgaacaatc ctctccaga aagtatgcca tgcgatctc tcctcccg c tatggacgtg 1560  
 tgggaggccg cgtctcaggt gtatacacta gagcccaagc gggcaaact ggcccaatg 1620  
 gatgtaaagc tgaagatct gtttcatct agggccgaat ttctctcagt cggaggatct 1680  
 cccagatga gctggaaaga ggccattata ttgggtctaa gatacaagaa attgtataat 1740  
 caagctgcc taaaatattc cctatagggt ataccata tgaaaaaac taacagaatt 1800  
 caaatgagt tctctcaaga aaatactcg cctgaaaggc aagaaggagg aaaagtccaa 1860  
 aaagttgga ctctctc cttacgagat gccagcaaac aatgagttcg agccaaatgc 1920  
 tccttagat cctgacatgt tcggggcggg acatttgag attgaaagca agtctgcat 1980  
 ggttatgag aaatttaagt tctctgcaa gatcaccctt aggaccaatc gaccttgag 2040  
 aacttatgat gatgtgccc agattctatc caaatgggat gcaatgatg tcggcatgat 2100  
 gggtaagca cggttctaca aggtattggt ctgatcggg tccagccact tgaggctac 2160  
 acctgctata ctctcagatc gtggcaacc agaatatcat atgtacttg aagatagagg 2220  
 attcatcga cacaggttg ggtgacacc gcaatgta agtgggcccg aaagtttag 2280  
 aagaccttc catgctggtc ttacagagg gacaattgac attacagtaa atctcatgga 2340  
 cgacgaatca acggaatcag caccacaggt ttgggatcac ttcaatcca gatatgtgaa 2400  
 tcattcctt gagcatgcaa agaggttcgg attggtcctg tccaagaaac caggtggcgg 2460  
 ctggatatta gatcaagcgg tctgtgata atgcgaatat aatcatagtc tcatcagacg 2520  
 attattata cattattcta ttctctct tagttggtg tagctatgaa aaaactaac 2580

agagttcaaa actctacatc tcaactgcaa aggctatfff tcttaaaaaa accttttaac 2640  
 acagagtcac cattcaaaaa tgaagatgaa aatggtcata gcaggattaa tcctttgtat 2700  
 agggatttta cgggctattg ggaaaataac aatttcttc ccacaaagct tgaaggaga 2760  
 ttggaggcct gtacctaagg gatacaatta ttgtcctaca agtgcgata aaaatctcca 2820  
 tggtgattg attgacatag gtctcagact tcgggccct aagagctca aaggatctc 2880  
 cgagatgga tggatgtgcc atgcggcaag atggatcacc acctgtgatt tcagatgga 2940  
 tggaccaag tacatcacc actcaattca ctcttcagg ccgagcaatg accaatgcaa 3000  
 agaagcaatc cggctgacta atgaaggaa ttggattaat ccaggttcc ctccgaatc 3060  
 ttgcggatat gcttctgaa ccgactcaga atccgtgtc gtaaccgtga ccaagcacca 3120  
 ggtcctagta gatgagtact cggctcatg gatcgatagt caattcccc gaggaagttg 3180  
 cacatcccc atttgcgata cagtgcacaa ctgcacactt tggcacgcg accacacct 3240  
 ggacagtac tgtgaccaag aattcgtggc aatggacgca gttctgtca cagagagtgg 3300  
 caaattgaa gagttcggaa aaccgaactc cggcatcagg agcaactatt ttcttatga 3360  
 gagtctgaaa gatgtatgtc agatggattt ctgcaagagg aaaggattca agtcccatc 3420  
 cgggtctgg tttgaaatcg aggatgcaga gaaatctac aaggcccagg ttgaattgaa 3480  
 aataaacgg tgcctcatg gagcagtaat ctgactctt aatcagaatg cagcagatat 3540  
 caatctgatc atggatgtg aacgaattct agactactcc ctttgccaag caactggag 3600  
 caaatccaa aacaaggaag cgttgacccc catcgatac agttatctt gtccgaaaa 3660  
 cccaggacca ggcccagcct tcaccataat aatggaaca ctgcactact tcaatactag 3720  
 atacattcga gtggatattg cagggcctgt taccaaagag attacaggat ttgttccgg 3780  
 aacatctaca tctaggggtc tgtgggatca gtgtcccat atggagagaa ttccattgga 3840  
 cccaatggct tgctgaaaac cggcagcga tacaatatc cattgttcat gttgtgata 3900  
 ggtgtctgg atgcggacat ccacaagctg ggagaagcaa ccgtgattga acatccacat 3960  
 gccaaagagg ctcagaaggt agttgatgac agtgaggta tttttttg tgacaccgga 4020  
 gtctcaaga atccagtga gtagtcgaa ggatggtta gcggatggag aagctcttg 4080  
 atgagcatat ttggcataat tttgtgatt gttgtttag tcttgattgt tcgaatcctt 4140  
 atagccctta aatactgtt tgtagacac aaaaagagaa ctatttaca agaggacctt 4200  
 gaaatggct gaattcctc gagggctta ttactataa ttacggactt taaatgatg 4260

aaaaaaacta taacagaagt caaaatggac ttcttaccgg ttgaacaaga ggaggactgg 4320  
 ggttatgcag aagatgattt ctctagctca gattatctag attttgaaga acgaatgaca 4380  
 tatttaaactc aggctgatta taatctaaac tcaccattga tatctgatga catttattac 4440  
 ctgagtcgaa aattccactc atatggcatc cccccatgt ggaacctcaa agaatgggat 4500  
 ggaccattgg agatgttaaa atcatgtcaa gcagacccga ttccacatga tctgatgcac 4560  
 aatggtttg gaacttggtt agaagacttt gatcacgact ctgcacaagg gatagtgttt 4620  
 ttaaggaag tagacaaaga ggctccgag acctatgatt tagtggatac cttttgaaa 4680  
 aattgggcag ggaaatccta tccttcaaaa gcaaggaga gatacttaga tcagatgaag 4740  
 atcattggcc ctttgtgca aaagttcctt gattgcaca agctgacatt gatcctcaat 4800  
 gctgttgctc ctgaagagtt gaaaaacctg ttacgaacat ttaaggaag aacgagagat 4860  
 ttatcgacca aagatccatg cactcggcta cgtgttccca gccttgggcc cgtattcata 4920  
 tgcaaaggct gggcttatat ccacaagcac aaaatttga tggaccgaaa tttctgctt 4980  
 atgtgtaaag atgtcataat aggacgcatg cagaccctat tgtctatgat aggtagatct 5040  
 gacgatgcac tcaactcagca agacttctc acccttgtaa atatctacag gacaggagat 5100  
 atcatcttac aagagaaagg aaacttgcc tatgacttaa tcaagatggt ggagcctatc 5160  
 tgcaatctga aattgatgaa attggcgaga gaatacagac cactgattcc ccctttcca 5220  
 cattttgaaa atcatgttaa aaatgcagtg gacgaacaat ctaaggctc gaggaggatc 5280  
 aaagttctct ttgagctgat tatgggaatc aaaaatgtgg atcttgcct ggtgatctat 5340  
 ggatcattta ggcattgggg gcatccattc atagattatt tcgaaggatt aaacaagcta 5400  
 cataagcagg taaccatgct gaaggagatt gacacggagt atgcaaatgc tctggcaagt 5460  
 gatttggcta gaatcgttct gactaaacag ttgactctg ttaagaagtg gttttagac 5520  
 aagacaaaaa tcccctctgc ccatccctt ttcaagcata tcatggataa cacatggccc 5580  
 actgccgccc agatccaaga ctttgagac cactggcatg aactgccgtt aatcaagtgt 5640  
 tatgagatac ctgacctcat cgatccatct atcatctatt cagacaagag ccaactcaatg 5700  
 aaccgatctg aggtgcttg acatgtgagg agatcccctc atttgccaat accgagcaaa 5760  
 aaggactcc agactatgct tgataccagg gcgacaaact gggttgagtt tctagaaatg 5820  
 gtagacaaac atggtcttga aaaggatgat ttgataattg gactcaaggg gaaagaacgt 5880  
 gagttaaact tagcaggtag attttttca ttgatgtcct ggaagttgag agaatacttc 5940

gttatcacgg aatatcttat aaaaacacat tttgtaccct tgtttaaggg gctgacgatg 6000  
 gcagatgatt taacttccgt catcaaaaag atgttgata gttcttccgg acaggaata 6060  
 gacgactact cttcagtgtg ttttgcaat catatagatt acgagaagtg gaataatcac 6120  
 cagagaaagg aatcaaacgg accagtgttt cgggtgatgg gccaatfff gggataccca 6180  
 cgtttgattg aacgaacca tgagtcttt gagaaaagtc tcatttatta taacaacaga 6240  
 ccggatctaa tgtgggtcaa tgaagacaca ctgattaatc gtacacaaca gcgagatgt 6300  
 tgggaaggtc aggctggagg ccttgagggg ttgaggcaaa agggttggag tatttcaat 6360  
 cttctgtga ttcagagaga ggcaaaaatt cgaaacacag cagtcaaggt attggcacia 6420  
 ggggacaatc aggtcatctg tactcaatat aagacgaaga aatccagaga tcagagtga 6480  
 ctcatcaatg cattagatca aatggtgaaa aacaacaaca aaattatgga ggaaataaag 6540  
 aaggaacga gcaaaactggg actattgatt aacgatgatg agaccatgca atcggtgat 6600  
 tatttgaatt acggtaaagt tccaatattc cgtggggtaa ttagagggtt agagacaaaa 6660  
 agatggccc ggtcacatg tgtgacaaat gatcaaattc caacgtgtgc caatctgatg 6720  
 gcttctgtct caactaatgc actaacagta gctcattttg cgtctaacc aatcaattca 6780  
 atgatacagt acaattactt cgtaacttt tcccactac tgttgtttat gcatgacca 6840  
 gcactgcgaa gatcacttta cgatgtgag aatgaaatac cgggattgca cagtaagact 6900  
 ttcaaatatg caatgctata tttggacca tctattggcg gcgtttcagg gatggcattg 6960  
 agtagattcc ttatacgtgc attcccggac cctgtaactg aaagcttatc tttctggaaa 7020  
 tttattcatg accatactga tgatgaatac ctcaaaagct tatcaattgc ctttggaat 7080  
 cctgatatag cgaattccg actagagcat atcagtaaac tgcttgagga tccaacttcc 7140  
 ctcaatatat ctatgggaat gagtcttca aatcttttga aaaccgaagt taaaaaatgt 7200  
 ctcatgaaa atagaacatc tatcaggaac gatattatca aagatgccac catctattg 7260  
 aaccaagagg aagcaaaatt gaaaagcttc ttatggtcta tcaatccact gtttctaga 7320  
 ttttgagtg agttcaaate tggcaccttc ctgggagat ccgaaggatt aatcagtcta 7380  
 ttcaaaaatt ctccgaccat ccgaaattcc ttcaaggta agtatcggaa agagctggat 7440  
 cacttgatcg tgaagagtga aatttctct ctcaaacatc tgggcggcat tcaactcaa 7500  
 ttggggaatg ggaaaatttg gggatgctcg tcatcccaat cagatttct tagatacaga 7560  
 tctggggaa gaaaactggt gggaactaca attcctcatc ctttggaat gcacggagca 7620

gcgagtccta aagaggctcc ttgcaccttg tgtaactgct ctggcctgac ttacatctct 7680  
 gttcattgcc cgaaggaat tacagaggta tttccagaa gaggaccctt accggcgta 7740  
 ctgggttcta agacatcga gaccactca attctcagc cttgggaaa agaaagtaag 7800  
 gttcctattg taagacgagc tactagactg agagatgcca tctcatgggt catagacca 7860  
 gattctacac ttgctcaatc tattcttgac aacattaaat ctttgacagg ggaagagtgg 7920  
 ggaggaagac agcatgggta taagagaact ggctctgcat tgcatagatt ttctacctca 7980  
 cgtatgagca atggagggtt tgcttctca agtcccggg ctttgaccgg attgattgct 8040  
 acgactgaca ccatgcacga ttatggagac aagaattatg atttcatggt ccaggcctct 8100  
 ttgtatacg cacagatgac tacatctata tccagatggg ggcatgtcgg ggcttgaca 8160  
 gatcattacc atgtccgttg tgacagctgc attcgagaaa tacaagagat tgaattgaac 8220  
 actggagtcc agtactctcc ccccgatgtg tcttatgttt tgacaaaatg gcggaacggc 8280  
 tcaggttctt ggggtactgt caccaacaa ccatcccga aagaaggaaa ctggaccgta 8340  
 ctctgcctg cagaacaatc ctatcaagtt ggacgggtga tccgatttct gtacggagat 8400  
 ctagtacata agaatcaca tcaagcggac gacagttcat tatttccggt aagcatacaa 8460  
 cacaagtga gagggagagg tttcttgaa ggtcttttag atggaataat gagagctagc 8520  
 tgttgtaag tcattcacag gagaagtgc gcaacctaa agcgtccggc aatgctgtg 8580  
 tatgggggag tcatattctt gattgacaaa ttgagtatgt cagccccatt cttgtcttta 8640  
 acccgactg gtctatcag ggaagaacta gaaaatgtcc ctacaaaat gccagcgtcc 8700  
 tacciaacta ataatcgaga tttgggatg accgtcagaa actacttcaa gtatcaatgt 8760  
 cgaatcattg agagaggaca gtataatcc cattatccca caatttggtt atttccgat 8820  
 gtcttatcgg tggactttat tggctctatg tcttgtcat ctggacttat gagattgta 8880  
 tacaagaaca gtctcagtaa gaaagacaaa aatgagctcc gagacttggc aaatcttca 8940  
 tctcttca gatcaggaga agaatggat gatatacatg tcaaattttt ctctcaagac 9000  
 ttactctttt gttctcagga gatacgacat gctgtaaat tgggattat acgagacaaa 9060  
 gtaagtctag aagtggatca tgggtggggg aaagaagcat atggaggatg tacagtgtt 9120  
 ccagtgttct acaggtctca gatttataag aaaagtttga ctgtaccccc acgaattcaa 9180  
 aacctatca tatctggact ccgcttgggg caacttcta caggagctca ttataagatc 9240  
 agatcaatca tcatgactct aaagatcaat tatcaggact tctgtcatg tggagacggt 9300

tcagggggga tgactgcctg cttgctccgg ttaaacccta atagtcgggg aattttcaat 9360  
 agtttgctag aattagatgg agcattaatg agaggatcat cccccgagcc acccagtgcg 9420  
 ctagagacgt tggggagcca aagaactcga tgtgtaaacg gaggaacatg ttggaacat 9480  
 ccctctgact tgagcgaccc caatacttgg aagtatttta ttggattgaa gagaggatta 9540  
 ggcttgacaga tcaatctgat tactatggat atggaagttc gagatccagt gatctcacac 9600  
 aaaattgaag caaacatccg agcatttctc tatgatcttt tagaccogga gggaaacctt 9660  
 atatacaaaa cgtatggcac atatctggca gaagaggaaa ggaatattct gacagaagta 9720  
 ggtcctttgt ttacactac tgacttggtg caaactattt acagtagtgc ccagacttcg 9780  
 gaggtttact gtgtatgcag acggttaaag aatatgctg atcaacaaca tgtggattgg 9840  
 tcattgtga ctgatggatg gtctcggta tatgcgtttt ctgtaatcg attggaattc 9900  
 caaagggtc agagtcttcg gaaactggac aactgcaag gaattccaag cttttcata 9960  
 ccagatcctt ttgtcaatgc ggagacttta ttgcaaattg caggtgttcc aacagggatt 10020  
 tctcacacag ccgtattaca tggatcgta cattctgaac aattgataac gcttggatt 10080  
 ttctctgtg cgtaatctc tcaccataca atgaacatca tacgaatate acctgtcccc 10140  
 ccgtctctc catccgatgg gtcaataagt agaatgtgtt ctgcaatcac agggatccta 10200  
 tttgggtct ccttagtggga gaaggactg actctataca actcattgtt gtcaataata 10260  
 cagagatcct ttccaatccg atggtacaaa aataaggaga aaaacggatg gtcccaatgt 10320  
 tggggggcaa atggagacgg gatacccaaa gatactcgac taaatgattc gatggcgaac 10380  
 ataggaaact ggataagggc tatggagttg ctttgcaata agaccgctca gatgcccttc 10440  
 tctccaagt tgttcaatcg attggccgca caatatgaca gagaattaac atggaagaag 10500  
 gtgttgcta aaacaggact tgcagattta ctaacaggac aaatttaca aattgatcga 10560  
 tcagttgcga atgtccggag cgagccgagt aatgagaact cttggcaaga ttagagcgat 10620  
 ccacaagtat gaaaaaaact aatccatag ccattttaa ttattgaaat tgatgaaatt 10680  
 ggcgtcgacc ggccgagatt ctggakccga tgcgta 10716

- <210> 8
- <211> 442
- 5 <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> Virus Carajas
- 10 <400> 8

Met Asn Ser Ile Val Lys Lys Val Ile Asp Asp Thr Val Ile Gln Pro  
 1 5 10 15

Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala Asp Tyr Phe  
 20 25 30

Lys Thr Ser Lys Gln Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr Asp Lys Thr Leu  
 35 40 45

Ala Glu Leu Arg Ala Phe Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Gly Asn Pro  
 50 55 60

Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr Leu Ala Leu Lys Asp Ile  
 65 70 75 80

Lys Ala Thr Leu Glu Arg Asp Trp Thr Ser Phe Ser Ile Thr Ile Gly  
 85 90 95

Lys Gln Gly Glu Glu Ile Thr Ile Phe Asn Leu Val Ser Val Arg Pro  
 100 105 110

Leu Val Ile Thr Val Pro Asp Gly Arg Thr Asp Pro Asp Arg Ser Pro  
 115 120 125

Asn Asp Asp Lys Trp Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val  
 130 135 140

Gly Arg Thr Lys Leu Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Glu Gly Leu  
 145 150 155 160

Glu Met Gln Cys Lys Ile Met Tyr Pro Asp Phe Val Pro Ile Val Pro  
 165 170 175

Glu Gly Met Asp Phe Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Phe Thr  
 180 185 190

Lys Ile Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His  
 195 200 205

Glu Arg Ala Ser Leu Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp  
 210 215 220

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Val Cys Lys Val Ser Gly Met  
 225 230 235 240

Ser Thr Glu Glu Val Thr Thr Trp Val Leu Asn Arg Glu Val Ala Asp  
 245 250 255

Glu Leu Cys Gln Met Met Phe Pro Gly Gln Glu Ile Asp Arg Ala Asp  
 260 265 270

Ser Tyr Met Pro Tyr Met Ile Asp Phe Gly Leu Ser Gln Lys Ser Pro  
 275 280 285

Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ser Phe His Phe Trp Gly Gln Leu Ala  
 290 295 300

Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Lys Asn Ala Arg Gln Pro Asp  
 305 310 315 320

Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr Ala Gly Leu Leu Leu Ala Tyr  
 325 330 335

Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Ile Ser Gln Gln Phe Tyr Met Gly Asp  
 340 345 350

Glu Lys Tyr Ile Ser Asp Pro Ser Ala Gly Gly Leu Thr Ser Asn Ala  
 355 360 365

Pro Pro Lys Gly Arg Asn Val Val Asp Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp  
 370 375 380

Gln Gly Gly Asn Ile Thr Pro Asp Met Tyr Thr Ser Leu Lys Gly Leu  
 385 390 395 400

Phe Ala Leu Cys Lys Gly Cys Glu Ile Arg Pro Leu Glu Ser Met Pro  
 405 410 415

Arg Glu Ser Leu Thr Ser Asp Ser Ile Gln Ile Lys Cys Phe Thr Thr  
 420 425 430

Cys Cys Ile Ile Tyr Asn Tyr Glu Lys Asn  
 435 440

ES 2 551 892 T3

<210> 9  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 5 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Virus Carajas  
  
 10 <400> 9

Met Gly Thr Tyr Thr His Leu Asp Ser Ala Leu Gln Asp Ala Asn Glu  
 1 5 10 15

Ser Glu Glu Ser Arg Asp Glu Lys Ser Asn Phe Asp Leu Phe Asp Glu  
 20 25 30

Glu Ser Lys Glu Val Ala Arg Pro Ser Tyr Tyr Ser Ala Ile Asp Glu  
 35 40 45

Glu Ser Asp Gln Glu Glu Thr Glu Ser Asp Asp Pro Asp Glu Glu Leu  
 50 55 60

Asn Asp Ser Asn Ala His Gly Ala Val Asp Gly Trp Asp Glu Thr Leu  
 65 70 75 80

Asn Glu Asn Ser Gln Pro Asp Asp Asn Val Ser Val Glu Phe Ala Arg  
 85 90 95

Thr Trp Ser Thr Pro Val Met Glu Ser Ser Ser Glu Gly Lys Thr Leu  
 100 105 110

His Leu Ala Met Pro Asp Gly Leu Asn Pro Asp Gln Val Ala Gln Trp  
 115 120 125

Leu Gln Thr Val Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu  
 130 135 140

Ser Glu Cys Arg Met Glu Val Leu Leu Glu Gly Val Leu Ile Lys Glu  
 145 150 155 160

Arg Gln Met Thr Pro Asp Leu Gln Lys Val Thr Pro Lys Pro Asn Asn  
 165 170 175

Pro Pro Pro Glu Ser Met Pro Cys Asp Pro Leu Pro Pro Ala Met Asp  
 180 185 190

Val Trp Glu Ala Ala Ser Gln Val Tyr Thr Leu Glu Pro Lys Arg Ala  
 195 200 205

Asn Leu Ala Pro Met Asp Val Lys Leu Lys Asp Leu Phe Ser Ser Arg  
 210 215 220

Ala Glu Phe Leu Ser Val Gly Gly Ser Pro Gln Met Ser Trp Lys Glu  
 225 230 235 240

Ala Ile Ile Leu Gly Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg  
 245 250 255

Leu Lys Tyr Ser Leu  
 260

<210> 10  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <223> Virus Carajas

10

<400> 10

Met Ser Ser Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Lys Glu Glu  
 1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys Leu Gly Leu Pro Pro Pro Tyr Glu Met Pro Ala Asn  
 20 25 30

Asn Glu Phe Glu Pro Asn Ala Pro Leu Asp Pro Asp Met Phe Gly Ala  
 35 40 45

Glu His Leu Glu Ile Glu Ser Lys Ser Ala Met Arg Tyr Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Phe Ser Val Lys Ile Thr Leu Arg Thr Asn Arg Pro Leu Arg Thr  
 65 70 75 80

Tyr Asp Asp Val Cys Gln Ile Leu Ser Lys Trp Asp Ala Met Tyr Val  
85 90 95

Gly Met Met Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Val Leu Val Leu Ile Gly  
100 105 110

Ser Ser His Leu Gln Ala Thr Pro Ala Ile Leu Ser Asp Arg Gly Gln  
115 120 125

Pro Glu Tyr His Met Tyr Leu Glu Asp Arg Gly Phe Ile Ala His Arg  
130 135 140

Leu Gly Leu Thr Pro Pro Met Leu Ser Gly Pro Glu Ser Phe Arg Arg  
145 150 155 160

Pro Phe His Val Gly Leu Tyr Arg Gly Thr Ile Asp Ile Thr Val Asn  
165 170 175

Leu Met Asp Asp Glu Ser Thr Glu Ser Ala Pro Gln Val Trp Asp His  
180 185 190

Phe Asn Thr Arg Tyr Val Asn His Phe Leu Glu His Ala Lys Arg Phe  
195 200 205

Gly Leu Val Leu Ser Lys Lys Pro Gly Gly Gly Trp Ile Leu Asp Gln  
210 215 220

Ala Val Cys Ala  
225

<210> 11  
<211> 519  
<212> PRT  
<213> Desconocido

5

<220>  
<223> Virus Carajas

10

<400> 11

Met Val Ile Ala Gly Leu Ile Leu Cys Ile Gly Ile Leu Pro Ala Ile  
1 5 10 15

Gly Lys Ile Thr Ile Ser Phe Pro Gln Ser Leu Lys Gly Asp Trp Arg  
20 25 30

ES 2 551 892 T3

Pro Val Pro Lys Gly Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn  
35 40 45

Leu His Gly Asp Leu Ile Asp Ile Gly Leu Arg Leu Arg Ala Pro Lys  
50 55 60

Ser Phe Lys Gly Ile Ser Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Arg  
65 70 75 80

Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr  
85 90 95

His Ser Ile His Ser Phe Arg Pro Ser Asn Asp Gln Cys Lys Glu Ala  
100 105 110

Ile Arg Leu Thr Asn Glu Gly Asn Trp Ile Asn Pro Gly Phe Pro Pro  
115 120 125

Gln Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu Ser Val Val Val  
130 135 140

Thr Val Thr Lys His Gln Val Leu Val Asp Glu Tyr Ser Gly Ser Trp  
145 150 155 160

Ile Asp Ser Gln Phe Pro Gly Gly Ser Cys Thr Ser Pro Ile Cys Asp  
165 170 175

Thr Val His Asn Ser Thr Leu Trp His Ala Asp His Thr Leu Asp Ser  
180 185 190

Ile Cys Asp Gln Glu Phe Val Ala Met Asp Ala Val Leu Phe Thr Glu  
195 200 205

Ser Gly Lys Phe Glu Glu Phe Gly Lys Pro Asn Ser Gly Ile Arg Ser  
210 215 220

Asn Tyr Phe Pro Tyr Glu Ser Leu Lys Asp Val Cys Gln Met Asp Phe  
225 230 235 240

Cys Lys Arg Lys Gly Phe Lys Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Ile  
245 250 255

Glu Asp Ala Glu Lys Ser His Lys Ala Gln Val Glu Leu Lys Ile Lys  
 260 265 270

Arg Cys Pro His Gly Ala Val Ile Ser Ala Pro Asn Gln Asn Ala Ala  
 275 280 285

Asp Ile Asn Leu Ile Met Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu  
 290 295 300

Cys Gln Ala Thr Trp Ser Lys Ile Gln Asn Lys Glu Ala Leu Thr Pro  
 305 310 315 320

Ile Asp Ile Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Pro Gly Pro Ala  
 325 330 335

Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu His Tyr Phe Asn Thr Arg Tyr Ile  
 340 345 350

Arg Val Asp Ile Ala Gly Pro Val Thr Lys Glu Ile Thr Gly Phe Val  
 355 360 365

Ser Gly Thr Ser Thr Ser Arg Val Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Tyr  
 370 375 380

Gly Glu Asn Ser Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys Thr Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Tyr Lys Tyr Pro Leu Phe Met Val Gly Thr Gly Val Leu Asp Ala Asp  
 405 410 415

Ile His Lys Leu Gly Glu Ala Thr Val Ile Glu His Pro His Ala Lys  
 420 425 430

Glu Ala Gln Lys Val Val Asp Asp Ser Glu Val Ile Phe Phe Gly Asp  
 435 440 445

Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Val Val Glu Gly Trp Phe Ser  
 450 455 460

Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Ser Ile Phe Gly Ile Ile Leu Leu Ile  
 465 470 475 480

ES 2 551 892 T3

Val Cys Leu Val Leu Ile Val Arg Ile Leu Ile Ala Leu Lys Tyr Cys  
485 490 495

Cys Val Arg His Lys Lys Arg Thr Ile Tyr Lys Glu Asp Leu Glu Met  
500 505 510

Gly Arg Ile Pro Arg Arg Ala  
515

<210> 12  
<211> 2109  
<212> PRT  
<213> Desconocido

5

<220>  
<223> Virus Carajas

10

<400> 12

Met Asp Phe Leu Pro Val Glu Gln Glu Glu Asp Trp Gly Tyr Ala Glu  
1 5 10 15

Asp Asp Phe Ser Ser Ser Asp Tyr Leu Asp Phe Glu Glu Arg Met Thr  
20 25 30

Tyr Leu Asn Gln Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp  
35 40 45

Asp Ile Tyr Tyr Leu Ser Arg Lys Phe His Ser Tyr Gly Ile Pro Pro  
50 55 60

Met Trp Asn Leu Lys Glu Trp Asp Gly Pro Leu Glu Met Leu Lys Ser  
65 70 75 80

Cys Gln Ala Asp Pro Ile Pro His Asp Leu Met His Lys Trp Phe Gly  
85 90 95

Thr Trp Leu Glu Asp Phe Asp His Asp Ser Ala Gln Gly Ile Val Phe  
100 105 110

Leu Arg Glu Val Asp Lys Glu Ala Ser Glu Thr Tyr Asp Leu Val Asp  
115 120 125

Thr Phe Leu Lys Asn Trp Ala Gly Lys Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Lys  
 130 135 140

Glu Arg Tyr Leu Asp Gln Met Lys Ile Ile Gly Pro Leu Cys Gln Lys  
 145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Gly Pro  
 165 170 175

Glu Glu Leu Lys Asn Leu Leu Arg Thr Phe Lys Gly Arg Thr Arg Asp  
 180 185 190

Leu Ser Thr Lys Asp Pro Cys Thr Arg Leu Arg Val Pro Ser Leu Gly  
 195 200 205

Pro Val Phe Ile Cys Lys Gly Trp Val Tyr Ile His Lys His Lys Ile  
 210 215 220

Leu Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Cys Lys Asp Val Ile Ile Gly  
 225 230 235 240

Arg Met Gln Thr Leu Leu Ser Met Ile Gly Arg Ser Asp Asp Ala Phe  
 245 250 255

Thr Gln Gln Asp Phe Phe Thr Leu Val Asn Ile Tyr Arg Thr Gly Asp  
 260 265 270

Ile Ile Leu Gln Glu Lys Gly Asn Leu Ala Tyr Asp Leu Ile Lys Met  
 275 280 285

Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Tyr  
 290 295 300

Arg Pro Leu Ile Pro Pro Phe Pro His Phe Glu Asn His Val Lys Asn  
 305 310 315 320

Ala Val Asp Glu Gln Ser Lys Val Ser Arg Arg Ile Lys Val Leu Phe  
 325 330 335

Glu Leu Ile Met Gly Ile Lys Asn Val Asp Leu Val Leu Val Ile Tyr  
 340 345 350

Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Phe Glu Gly  
 355 360 365

Leu Asn Lys Leu His Lys Gln Val Thr Met Ser Lys Glu Ile Asp Thr  
 370 375 380

Glu Tyr Ala Asn Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Thr  
 385 390 395 400

Lys Gln Phe Asp Ser Val Lys Lys Trp Phe Val Asp Lys Thr Lys Ile  
 405 410 415

Pro Ser Ala His Pro Phe Phe Lys His Ile Met Asp Asn Thr Trp Pro  
 420 425 430

Thr Ala Ala Gln Ile Gln Asp Phe Gly Asp His Trp His Glu Leu Pro  
 435 440 445

Leu Ile Lys Cys Tyr Glu Ile Pro Asp Leu Ile Asp Pro Ser Ile Ile  
 450 455 460

Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Gly His  
 465 470 475 480

Val Arg Arg Ser Pro His Leu Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln  
 485 490 495

Thr Met Leu Asp Thr Arg Ala Thr Asn Trp Val Glu Phe Leu Glu Met  
 500 505 510

Val Asp Lys His Gly Leu Glu Lys Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys  
 515 520 525

Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met  
 530 535 540

Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys  
 545 550 555 560

Thr His Phe Val Pro Leu Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu  
 565 570 575

Thr Ser Val Ile Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser Ser Gly Gln Gly Ile  
 580 585 590

Asp Asp Tyr Ser Ser Val Cys Phe Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys  
 595 600 605

Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Phe Arg Val  
 610 615 620

Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Arg Leu Ile Glu Arg Thr His Glu  
 625 630 635 640

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Asn Arg Pro Asp Leu Met  
 645 650 655

Trp Val Asn Glu Asp Thr Leu Ile Asn Arg Thr Gln Gln Arg Val Cys  
 660 665 670

Trp Glu Gly Gln Ala Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp  
 675 680 685

Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn  
 690 695 700

Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr  
 705 710 715 720

Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asp Gln Ser Glu Leu Ile Asn Ala  
 725 730 735

Leu Asp Gln Met Val Lys Asn Asn Asn Lys Ile Met Glu Glu Ile Lys  
 740 745 750

Lys Gly Thr Ser Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met  
 755 760 765

Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Val Pro Ile Phe Arg Gly  
 770 775 780

Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val  
 785 790 795 800

Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Leu Met Ala Ser Val Ser  
 805 810 815

Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Ser Asn Pro Ile Asn Ser  
 820 825 830

Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Asn Phe Ser Arg Leu Leu Leu Phe  
 835 840 845

Met His Asp Pro Ala Leu Arg Arg Ser Leu Tyr Asp Val Gln Asn Glu  
 850 855 860

Ile Pro Gly Leu His Ser Lys Thr Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu  
 865 870 875 880

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ala Leu Ser Arg Phe Leu  
 885 890 895

Ile Arg Ala Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe Trp Lys  
 900 905 910

Phe Ile His Asp His Thr Asp Asp Glu Tyr Leu Lys Ser Leu Ser Ile  
 915 920 925

Ala Phe Gly Asn Pro Asp Ile Ala Lys Phe Arg Leu Glu His Ile Ser  
 930 935 940

Lys Leu Leu Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ser Met Gly Met Ser  
 945 950 955 960

Pro Ser Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Ile Glu Asn  
 965 970 975

Arg Thr Ser Ile Arg Asn Asp Ile Ile Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu  
 980 985 990

Asn Gln Glu Glu Ala Lys Leu Lys Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro  
 995 1000 1005

Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Leu  
 1010 1015 1020

Gly Val Ser Glu Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr  
 1025 1030 1035

Ile Arg Asn Ser Phe Lys Gly Lys Tyr Arg Lys Glu Leu Asp His  
 1040 1045 1050

Leu Ile Val Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys His Leu Gly Gly  
 1055 1060 1065

Ile His Phe Lys Leu Gly Asn Gly Lys Ile Trp Gly Cys Ser Ser  
 1070 1075 1080

Ser Gln Ser Asp Leu Leu Arg Tyr Arg Ser Trp Gly Arg Lys Leu  
 1085 1090 1095

Val Gly Thr Thr Ile Pro His Pro Leu Glu Met His Gly Ala Ala  
 1100 1105 1110

Ser Pro Lys Glu Ala Pro Cys Thr Leu Cys Asn Cys Ser Gly Leu  
 1115 1120 1125

Thr Tyr Ile Ser Val His Cys Pro Lys Gly Ile Thr Glu Val Phe  
 1130 1135 1140

Ser Arg Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser  
 1145 1150 1155

Glu Thr Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Lys Glu Ser Lys Val  
 1160 1165 1170

Pro Ile Val Arg Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp  
 1175 1180 1185

Phe Ile Asp Pro Asp Ser Thr Leu Ala Gln Ser Ile Leu Asp Asn  
 1190 1195 1200

Ile Lys Ser Leu Thr Gly Glu Glu Trp Gly Gly Arg Gln His Gly  
 1205 1210 1215

Tyr Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg  
 1220 1225 1230

Met Ser Asn Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Pro Ala Ala Leu Thr  
 1235 1240 1245

Arg Leu Ile Ala Thr Thr Asp Thr Met His Asp Tyr Gly Asp Lys  
 1250 1255 1260

Asn Tyr Asp Phe Met Phe Gln Ala Ser Leu Leu Tyr Ala Gln Met  
 1265 1270 1275

Thr Thr Ser Ile Ser Arg Trp Gly His Val Gly Ala Cys Thr Asp  
 1280 1285 1290

His Tyr His Val Arg Cys Asp Ser Cys Ile Arg Glu Ile Gln Glu  
 1295 1300 1305

Ile Glu Leu Asn Thr Gly Val Gln Tyr Ser Pro Pro Asp Val Ser  
 1310 1315 1320

Tyr Val Leu Thr Lys Trp Arg Asn Gly Ser Gly Ser Trp Gly Thr  
 1325 1330 1335

Val Thr Lys Gln Leu Ile Pro Lys Glu Gly Asn Trp Thr Val Leu  
 1340 1345 1350

Ser Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe  
 1355 1360 1365

Leu Tyr Gly Asp Leu Val His Lys Lys Ser His Gln Ala Asp Asp  
 1370 1375 1380

Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln His Lys Val Arg Gly Arg  
 1385 1390 1395

Gly Phe Leu Glu Gly Leu Leu Asp Gly Ile Met Arg Ala Ser Cys  
 1400 1405 1410

Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Val Ala Thr Leu Lys Arg Pro  
 1415 1420 1425

Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Val Ile Phe Leu Ile Asp Lys Leu  
 1430 1435 1440

ES 2 551 892 T3

Ser Met Ser Ala Pro Phe Leu Ser Leu Thr Arg Thr Gly Pro Ile  
 1445 1450 1455

Arg Glu Glu Leu Glu Asn Val Pro His Lys Met Pro Ala Ser Tyr  
 1460 1465 1470

Pro Thr Asn Asn Arg Asp Leu Gly Met Thr Val Arg Asn Tyr Phe  
 1475 1480 1485

Lys Tyr Gln Cys Arg Ile Ile Glu Arg Gly Gln Tyr Lys Ser His  
 1490 1495 1500

Tyr Pro Thr Ile Trp Leu Phe Ser Asp Val Leu Ser Val Asp Phe  
 1505 1510 1515

Ile Gly Pro Met Ser Leu Ser Ser Gly Leu Met Arg Leu Leu Tyr  
 1520 1525 1530

Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Asp Lys Asn Glu Leu Arg Asp Leu  
 1535 1540 1545

Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu Arg Ser Gly Glu Glu Trp Asp Asp  
 1550 1555 1560

Ile His Val Lys Phe Phe Ser Gln Asp Leu Leu Phe Cys Ser Gln  
 1565 1570 1575

Glu Ile Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile Ile Arg Asp Lys Val  
 1580 1585 1590

Ser Leu Glu Val Asp His Gly Trp Gly Lys Glu Ala Tyr Gly Gly  
 1595 1600 1605

Cys Thr Val Leu Pro Val Phe Tyr Arg Ser Gln Ile Tyr Lys Lys  
 1610 1615 1620

Ser Leu Thr Val Pro Pro Arg Ile Gln Asn Pro Ile Ile Ser Gly  
 1625 1630 1635

Leu Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile Arg  
 1640 1645 1650

Ser Ile Ile Met Thr Leu Lys Ile Asn Tyr Gln Asp Phe Leu Ser  
 1655 1660 1665  
 Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Cys Leu Leu Arg Leu  
 1670 1675 1680  
 Asn Pro Asn Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Asp  
 1685 1690 1695  
 Gly Ala Leu Met Arg Gly Ser Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala Leu  
 1700 1705 1710  
 Glu Thr Leu Gly Ser Gln Arg Thr Arg Cys Val Asn Gly Gly Thr  
 1715 1720 1725  
 Cys Trp Glu His Pro Ser Asp Leu Ser Asp Pro Asn Thr Trp Lys  
 1730 1735 1740  
 Tyr Phe Ile Gly Leu Lys Arg Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asn Leu  
 1745 1750 1755  
 Ile Thr Met Asp Met Glu Val Arg Asp Pro Val Ile Ser His Lys  
 1760 1765 1770  
 Ile Glu Ala Asn Ile Arg Ala Phe Leu Tyr Asp Leu Leu Asp Pro  
 1775 1780 1785  
 Glu Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Leu Ala Glu  
 1790 1795 1800  
 Glu Glu Arg Asn Ile Leu Thr Glu Val Gly Pro Leu Phe His Thr  
 1805 1810 1815  
 Thr Asp Leu Val Gln Thr Ile Tyr Ser Ser Ala Gln Thr Ser Glu  
 1820 1825 1830  
 Val Tyr Cys Val Cys Arg Arg Leu Lys Lys Tyr Ala Asp Gln Gln  
 1835 1840 1845  
 His Val Asp Trp Ser Leu Leu Thr Asp Gly Trp Ser Arg Leu Tyr  
 1850 1855 1860

Ala Phe Ser Val Asn Arg Leu Glu Phe Gln Arg Ala Gln Ser Leu  
 1865 1870 1875

Arg Lys Leu Asp Thr Leu Gln Gly Ile Pro Ser Phe Phe Ile Pro  
 1880 1885 1890

Asp Pro Phe Val Asn Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ile Ala Gly Val  
 1895 1900 1905

Pro Thr Gly Ile Ser His Thr Ala Val Leu His Gly Ser Leu His  
 1910 1915 1920

Ser Glu Gln Leu Ile Thr Leu Gly Ile Phe Phe Cys Ala Leu Ile  
 1925 1930 1935

Ser His His Thr Met Asn Ile Ile Arg Ile Ser Pro Val Pro Pro  
 1940 1945 1950

Ser Pro Pro Ser Asp Gly Ser Ile Ser Arg Met Cys Ser Ala Ile  
 1955 1960 1965

Thr Gly Ile Leu Phe Trp Val Ser Leu Val Glu Lys Asp Leu Thr  
 1970 1975 1980

Leu Tyr Asn Ser Leu Leu Ser Ile Ile Gln Arg Ser Phe Pro Ile  
 1985 1990 1995

Arg Trp Tyr Lys Asn Lys Glu Lys Asn Gly Trp Ser Gln Cys Trp  
 2000 2005 2010

Gly Ala Asn Gly Asp Gly Ile Pro Lys Asp Thr Arg Leu Asn Asp  
 2015 2020 2025

Ser Met Ala Asn Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ala Met Glu Leu Leu  
 2030 2035 2040

Cys Asn Lys Thr Ala Gln Met Pro Phe Ser Pro Lys Leu Phe Asn  
 2045 2050 2055

Arg Leu Ala Ala Gln Tyr Asp Arg Glu Leu Thr Trp Lys Lys Val  
 2060 2065 2070

ES 2 551 892 T3

Leu Ala Lys Thr Gly Leu Ala Asp Leu Leu Thr Gly Gln Ile Ser  
 2075 2080 2085

Gln Ile Asp Arg Ser Val Ala Asn Val Arg Ser Glu Pro Ser Asn  
 2090 2095 2100

Glu Asn Ser Trp Gln Asp  
 2105

<210> 13  
 <211> 12416  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Virus Bahia Grande

<400> 13

5

10

acaatattag ataaactcct ctacttctta actatcgta gacatggccg ccgcaatact 60  
 tccagtttct cgtaacatgc ctgtcagaga aaggacagtg gcaggaagtg taacagcgcc 120  
 accagttcag tatccaagca cctggttcca agcccatgcc ggacaaaaag ttcaataac 180  
 tattatcaa aatactaatag cacgacaagc tttctccaga attactcaac tcagaaacaa 240  
 cggacaatgg gatgataaat tgatcgctac tttcatgaaa ggtgtcttg atgaaaatgc 300  
 tgaatggttc caaagccctc ccttcattga ggactggatt gtaaataag cagtcacgg 360  
 aagagtagat gacgtagttg cacccactgc acttgcacag tgggaagagg ttgaaaggcc 420  
 tcaaacatg gatccagtac ccaatgagga aggagaactg gggactcgga ggtcattttt 480  
 cttggcatta atcacatct acaggcaagt actgacaaga accatcaatg tggactacgg 540  
 ccaagaagtg agcagaagga taatagataa tttcaaagaa caaccttag gtatgtcaca 600  
 ggatgacata aatgaaatcc aggggtatga atcaaaagaa aggctaacta caaattatgt 660  
 gaaaatctta tgcatccttg atatgttctt caataagttt cagacccatg acaaaagcac 720  
 catcaggata gctactttac caacaagata tagaggatgt gctgcattca cttcatcgg 780  
 agaactagca ataagattgg gaattgaacc cataaagctg cccagtttga ttcttacagt 840  
 agcagtgccc aaagatttcg ataagatcaa tgtcaatgga gagcaagcag agcaattaga 900  
 tggatatttt ccatatcaat tagagttggg attagttaa aagagtgcct attcagcagg 960  
 aaattgtcca tctttatact tatggatgca caccatagga acaatgctcc atcaacaag 1020  
 atcttatcga gccaatgttc ccaaaaatgt accagacca atgggaacaa taaattctgc 1080

aattgctgtt gccatgcagt ttgttgctgg gggagagttc agtatgcaat ttgtagggga 1140  
tgacagagtt caagaagcca tgagagaaat gcaaacagca gaagctgaat tgaatgagtt 1200  
aagaatggct caggcaagag aatgagagc tgacagcaaga ggagatgaag atgaagaagg 1260  
ctctgaagat ggacttgatg atgaaaatga tggagaaggg gatgatgagt taccagctga 1320  
aattgaacaa aatcctgaat atttaaatag agtcaacagg atcagagaat tacaagaaaa 1380  
cctccaacaa tacaacgcaa cagtacaaca gcacactaat gcggtagaaa aagccgcact 1440  
cagagcactc gcttatcttc aagaaaatgg aggaattgca gataaggaca agagagactt 1500  
gggtataaga ttcaggaggt ttgctgatga agcggaaggt agagtcggta aattattagc 1560  
cagttgttc cctgccccga gataaatatt ctttcaggtc tcattttctt attttataaa 1620  
tattttatcc agattttaat ttctttatct actgtattat ttattcaaa tatgttttca 1680  
attaattttt tcttctttat atgttatatt ctatacatat gtaaatgttc atgaaaaaaa 1740  
caacaaatct cataagatac tcgtttaaag aatggctta ttcaactggt tgattaaag 1800  
gtgaagtgtc ccaaggattg tctaatacat ttaaagatgc aggaatacat caaatagaat 1860  
taaataaaga atatgacaat ttatcaattt tgggggcca catgagtgca ttgaataaaa 1920  
tgtttgacac agaagatgaa gggttatctg atactaatac taactcatca aaaaactcta 1980  
ttttacaagc gagtgateatg ttcataggaa atgatgaata tgaatcagat gactctcatc 2040  
attttctaag ctacactagt ccagataaag gaagcagtgca agaaggaagc aacctccaag 2100  
aattcaattt tcagatacct agaaacaagg ttggaaaaga aaaggcatac aggaggggag 2160  
tcattgatgt attggatttt ctacagagac acagatttat agaagaattc cgtatggaag 2220  
gacttaatga ggateatagtc tgateatcc ctacaagagg aatgatcccc acaaaaacac 2280  
ccctaccct ggatgacaaa attcatcttg ctaacgatca gtcaatagaa aaagaagaaa 2340  
tcttcaaaa agacaagaca tcaaaaccaa acaaggaat caaacagcca aacaagcaag 2400  
aggcacaacc agtctctgaa tctcaaacag gaatgaagga agacaaaaaa gaacaaaagc 2460  
caaagcaaaa ccaaattccc attaaaaaca aacaggaaaa tgaagactca aaagaagttg 2520  
ctaagaccaa caagataaa gaaaataaag tcagcaaagg aagtatgtca aagaatgaca 2580  
aactaaaaga aggcaatata actgttccaa aacagggatt tgaaaagaag aaaacaaaac 2640  
aaataaatga agaaggccac aatcatttg attatgctaa tacatatggg acaaaagtca 2700  
ctgtgaaaac tataaggtat tgtaagacat gcaatcctaa tactagaaaa aatgctacag 2760

tatatcttga ccatctttat gaacgccaca gtcacgaggt tgctttgatt aahagcttgg 2820  
 cttaccctct tttatcttwt ttwwggttga wttaaattaa ctaattagat acttlyttaa 2880  
 tacatgawaa wwacaacaaa tctaataaat tacattgaaa caaagatgtc tgggtgtgatg 2940  
 agtatattta aaaggaagga caagaaaggg aatgaggggt ccaaagccct agccatacca 3000  
 gatgaaaaat cagtagtccc atctgcacct ccagacatct cagctatgga ttatgggagg 3060  
 tttggtttat tagggaggca aactctatta gaagaagatg aggaagaatc tagatgcatc 3120  
 actattatag atctagaagt cgatctacag atagaggtgt tatctaataag agaaactcga 3180  
 cttgtaatag acttgattgc tcctttgtgt aatcttcaaa ctgattacat tggaaaagag 3240  
 aacacaaaag caatttggat aggattaact gtagtagcag cttttggagt gaaaagaacc 3300  
 attaagacaa aaaatcatca tgtatataaa ggggtgtgtct ccagtgact taggctttta 3360  
 atagactcag aaaaacaatt tgagctagat aagaggaata aatgstctca gcatctcagt 3420  
 tatctacca atgggtgtaa aacagagtgg gccataagag gggagatgat caggacaaga 3480  
 gtaccttacc ttctcagcc aggaagtgg gatgtgctta tgttttagc agggatggga 3540  
 ataagttgtt attcaaatcc agatggtcat ttagtctca aagtttgaaa aataacaaaa 3600  
 ttcttagag atcatattca gtatttatac cttagtaata ttgtggctca gatttaatga 3660  
 tgggagtgcc taaagtattt caattttggg ttagaatcag gacatgaaaa aacaacaaa 3720  
 tctaattaac tatcatttag tacttagaac gaacttatct tctgttgaat catgatttcg 3780  
 aatatgtttt tctgtttca acttcatta ttctacagt ttatagcagg agatgagtca 3840  
 ttgaaacaa taacagcccc tgaaactcct gacctatac tcttaaagag agatacaaaa 3900  
 tatctgttct tagtcccttc ttctgtcaaa aattggaac cagctgacct gaatgaatta 3960  
 acatgcccc ccctaatttc gaaaccagat acttctgaaa tgacttattt ttccacagat 4020  
 gtgatggagt tacaaaaaca tcatgaattg gcaccagtag aagggtattt atgttcgggt 4080  
 ttgcgttaca aagtaatatg ttctgaagga tttttggac aaaaaaat agcaaaaaag 4140  
 attgagaaca ttgaacctga tagtaacaa tgccttgatg acttgtcaaa atttaagaat 4200  
 gatgattacc tactcccata tttcccttct gaagattgta attggatgaa agagactccc 4260  
 acccataaag atttatagt tttcaaaaa cattttgta aatatgacct atacaataat 4320  
 ggttttatg atccttact taaaaagac tactgtgata ctcaagtctg tgagacagaa 4380  
 catgatcaaa ctatttggat aacagaaaag agtattgaaa atgaatgcat ctcaattat 4440

ccgattaaaa agcatatatt ccatacagct gactttggga aatgataat agattacgaa 4500  
 ttaatcaat ggacttcagt ggaagatggg tgtttaatta actattgtgg aagagagggg 4560  
 ataaggttat ctaatgggat gttctttgta ggtaagtct ataaaaatct caataattta 4620  
 cagacctgta gtgctggaac aaaggtcagt tacaagcctt taacctcaa gctggaagaa 4680  
 attgaaaatg aatcattct agatcaggaa agattattat gtcttgattc aattaggcaa 4740  
 atgacagcaa caaaaaaatt atcattttat tctttatcct ttctagaacc aaaatcttct 4800  
 agtaggcaca aggtctttag aattcataat aaaacactag aatataccga aaccgaatgg 4860  
 catccaatca tgcgtttaa ttttgatgaa ccaacaaaa ttggaattga caagaatgt 4920  
 aatcagttt attggaatga atgggttct agtgaatat ctgggctgtt atcagggttc 4980  
 aatggagtct acaaaaaaga aatgaaact aaagtaacta tgccccgatt agaacaata 5040  
 aaagaagatt atgatagggg gatgatgata gatcaccgagt tggtagaggt agaacatcct 5100  
 aaaattgtac acttaaaaag agagaacatc acaggatcta gagtcgaaat tgtaataaaa 5160  
 gaacattctg atgtgagtgg ttggctgtca ttagtattga gtagttttg gggaaaaatc 5220  
 atgatgaaa taataagtat aatcttaac gtaataatag gattagtttt aataaactgc 5280  
 tgcccaatta tatgcaaatc atgtattaaa cgttataaaa caaaggaaga atccccgaat 5340  
 agacatagat tggatagaga agataacggg agattgagga ggcaacatcg agttattttt 5400  
 aacaatcaat ccaatgatga agaaaatgcc attgaaatgg tagaatatac tgacactccc 5460  
 aggccattgc gaccgattcc tgatgccaca acatcagaca ctgagtcaag atccccaca 5520  
 acagcccata gtttttcaa ccgttaaaaa ggtaggttat attatacttt tctctatacc 5580  
 tctaagtc atcatcgtgt ttttgtgtt attagataga aaacatctca aatataatcc 5640  
 ttaaaggca tggaaactt caataattac aattaaaga cctfattaa attaaaaagt 5700  
 tttcttaaa ataattctcc taattgattt taattcatg aaaaaacat taahaaatct 5760  
 aagtatmact saaatttagg gtatgcttg tgtgttaaaa tggatttctc ttatgaacaa 5820  
 ttgctggatc ctatagatgt cttagaagaa gaattatag aattgattt cgaatatgat 5880  
 gattacactg atgatgatca gacaccctta ccaatatta agtacaaaaa ctagaaggt 5940  
 aaagactata atttaaactc acctctcatc agcgatgtga tggattcagg aagagaatac 6000  
 ataattaatt ctaaaaagta ctttctcat gaaagaacaa atccggagtt ggaacaattt 6060  
 agtaaagctc taatggctat tgggttttct agattgatt tacgaaaatc atcagaacat 6120

cataggtaca tgagttcata tatatatgga aatgagaaaa aacatatgaa aatcgaaata 6180  
 ataccagat ggaagaagt cttagaactg actcgcaatc ctgtagaagt aacctctcat 6240  
 aagatattgg gatcaaaatc acaatctgat caagaaggat atataaatag attgcgatat 6300  
 attacagtag atggacctca tgcaagaaaa acaagattac accaagaatg ggaaaaattc 6360  
 tcaacattac attatataac gtatattatg aattcaaaag cctttagtga caacaaaaat 6420  
 tgggtgaggg aagtctttga gaccatagaa actagtgaag ttgacctga aataattaca 6480  
 ataattgga caggtttatc aaagaaagaa gtatcttga ttatatctga gaactttgca 6540  
 ttaaagtta gaacaggttt atttgtctcc aaagatttct tgctgatgat taaagatgtc 6600  
 accttagcta gatgatgag caaactgagt atgattaaca gaaagtctcc caacacaact 6660  
 tatgatatga taaaattttt ggatagtcta tatgaaagtg gtgacaaaat attgacaaga 6720  
 catggaaatt tagcttaca gcatatcaag ttattggagg cagcttgtct agagagatgg 6780  
 aatcaattag ggcacaaatt cgaccattg afaccaatct ctcaagcat gagtgatcat 6840  
 cttagaactc aattagaaga aatcaagat ctctatatgg tgagttagga attcttcgat 6900  
 ttgattgga agattgaaga tccttgggtc gttgctcaag cgtatggaac attcaggcat 6960  
 tggggacatc catacattga ttatttaaat ggtctaaaag atctagaaaa aagagtaaat 7020  
 gaaaatatca aaattgataa aaattatgca gaaaaattgg cttagcatct tgcgtttata 7080  
 gttctaaaag accaatttgg aaaacataaa agatggtttg ctaaacctaa taaagaattg 7140  
 gatgaaaata atccatgcg aaaatgcata gaaaacaatg tgtggcctaa cactaaagtt 7200  
 attttagact tcggagacaa ttggcataaa ttagaattat taccatgttt tgaatccct 7260  
 gatgcaatag accttctga cctatatagt gataaagctc attccatgca atacagtga 7320  
 gtattaaatt atgtaaaata caaaaaatcc aaaaagaata tcctgcctt acgtgttatc 7380  
 gggacattat tagaaaagga aaatccaaat ataaaagaat tttacaaaa aataaacgat 7440  
 gaaggtttag atgatgatga tctgataata gggctgaaag caaagaaaga gaactgaaag 7500  
 ataaaggaag attttctct cttagagtt ggaatattag gttatatttt kgtattacag 7560  
 aatatttaat twwwttwaw tttktmcca ttgtttctg gcttaacagt agcggatgac 7620  
 ttaaatactg dcmsmmamrr attmttaagt gctacagaag gacaaggctc agatgactat 7680  
 gaaaggtct acatagcaa tagtttagat tatgaaaaat ggaacaacag gcagcgttat 7740  
 gaatctaag aaccagtatt cacagtaag gggaaatttt taggttatcc aacttaata 7800

tcgtatactc ataagatttt tgaagatca tttatctatt ataacggaag actagactta 7860  
 atgggagtag atggttacca tattataat ttattgatg ataaaatggt ctgttgcat 7920  
 ggtcaattgg gaggattga aggtgtaaga caaaagggt ggagtgttt aaactactta 7980  
 attttgcgaa gagaagctgc aacacgaaat actgcaccga aatttttagc ccaaggagac 8040  
 aatcaaattg tcattactca gtatacattg accagtaaaa gcaactcaagc tataattgaa 8100  
 cgagaattga ggaatatttg ggaaaacaat gctcatataa tgcataggat acaacaagcg 8160  
 acaagtcgaa ttggattagt cataaataat gatgaagtgt taactccgc agagtattg 8220  
 gtttacggta aaataccagt atttcgaggg aaattgttac ctttagaaac aaaaagatgg 8280  
 tctagagtca gtaccgtgac aatgaacag ataccatcct tttctaattc attggctagt 8340  
 agtacaacta ctgcttggc ggtaataca cactcagaaa atcctatcga ggttatatct 8400  
 caacatcatt tcttagttc tttgctggc acattagtaa catttgtaa tcctatctta 8460  
 ggttttgatc cgattaaata ttctcaattg tcagagagaa ataagaagt attcttatta 8520  
 aggctattt acaagatcc aagtgtggg ggagtgtg gaactaattt attaaggtt 8580  
 tttatatcaa gatttctga tctttgaca gagacattga catggtggaa aatattggtt 8640  
 gagaattcta aagataaaga ggttgtaaa attgcgctag aatgtggaa tcctaagttt 8700  
 ggagggatta atgataagac attagctatg ttactcgaag accctatgtc actaaatata 8760  
 ccaggaggac tctcaagtga cacgatgata aaaaacaaaa ttatgaagg tcttattcat 8820  
 caaatgggc ttaaattgat caaaaatgaa ttggtgtag aatcttaac ctctataat 8880  
 gattacaaag cacaattgt aagatggtta ttccataa gaccaattt cccacgattc 8940  
 attagtgaat ttatacatc tacttattt tatataacag aaagtcct tgccatattt 9000  
 caaattcta gaaccattag aaaagtttc tcaaaaagat ttccgaaaga ggttatctc 9060  
 acgatagta aaggagaaca aatgtctata gatagcttat tgacaacca aagagggatt 9120  
 gttagggagg ctatttgaa atgttcagca acgaaagcag atgaaatgag aaaactatca 9180  
 tgggtagag atatggttg aataacaaca cctcatccag ctgaattcac acaagaatta 9240  
 ttatgttcag acgggtgtc agaacctcac attgtagcca aaaagggtt ttactctgat 9300  
 agaaaattat ggactaaggg taagatgatg cttaccttg gtactaaaac caaagagtc 9360  
 acaagtatac ttcaacctg ggaaaaaaga tttagattc cattattgag gaaagcatgt 9420  
 gattaagaa aagccattag gtggttgta gaagataatt caaacttagc aaaatccatt 9480

tataaaaatt tagaaagtat gacaggaatt gatttaagag aagaacttcg aaactataaa 9540  
agaactggta gtagcaaca tagattaaga aactcgagag tctccaatga aggtaatccc 9600  
gccataggtt ataataacct aacgtatgtc acagtaacaa ctgatagttt aggaaatatt 9660  
aattccgaaa attatgattt catgtatcaa tctatcttat gctgggtggg tgtattatcg 9720  
tccctagcaa ccaatcgata tcgagacat gagactactc atttcatct taaatgtaat 9780  
gattgcttca gattggtaa agaggaaata ttagaggctc cttcagttta cccatttct 9840  
aatgtaagat cctctgtaag gagaatgctt acacaggata ttaaattaa atatctgcca 9900  
cgaatttctg cccctgatga aaacacctgg gatactctgg atgttgatca aaaaagttgg 9960  
catattggga gagtcaagg gttttgtgg ggattaaatg tattaccaaa aaccactaaa 10020  
gaggttgagg gtgacattt cccaacttc ataacgaaaa aagtcgaacc agaaaattac 10080  
atggatggtt tacacagagg gttttgtta ggagctactc tctccccat gtacacaaga 10140  
tatggatcac tcagcaggat ggctagaaga aaattcgaag gagcactctg ggaaatcgta 10200  
gatgaagcaa tgaaaactaa tctaccaaat atgattgatc amaaaaattt caaaccttc 10260  
ctgagaagga caggaggtga tctaattaa tcttatctg cacgaaagga agagttggt 10320  
ctgttttaa agaaatggtt cttacataaa atggtctctg aaagaaaaaa caattcata 10380  
tgggaaagta aaagagtaat tgcctttgct gacatggaca ctgaattgt attgtgtctc 10440  
ttcagattag cggaaagcat actgaattgt tatcaaatg aagctttatc tgctggtcag 10500  
gctaggtct tagggaatgc aaaagagaca atagatctga tctcaaaata caataactca 10560  
aacattaatg cagatgagat tgagcgattg cagcagatat tgatggcttc tgacctgaaa 10620  
gatcatgaag ttgtagattc acaagctagg catgctgctt ctgacttacc tgaattggca 10680  
aatcagaaa attacaatga agtgattaa tatgtagaat ttagaggta tggtggttaa 10740  
accataagat tagaatatca acctagtat ttgatagact ggaagggagg aatggtcaa 10800  
gacctacaag tacctagatt gaagaacct ttaatttctg gactcagagt agtcaatat 10860  
agcacaggag ctattataa atataagat atagaaagag aattcaaat tgctggtgat 10920  
ggatattcg ctggtgatgg ttctgggtgt atgggtgcaa accatctgag attacataaa 10980  
tcagcccgcg ttatatttaa ctctaaatta gattagaag gagaatctt aaaagggtta 11040  
gccctgcag gacctggagc ttacacggtc tcaggtgaag atgttggtga aagatgtgtc 11100  
aattacacaa cttgctggga agaagcttct gatctgagt acgaaaaaac ttggaagaat 11160

ttttttaggc tcataaaaga gtactcatta gatatagaag tgttttgctg t̄gatgctgaa 11220  
 gtccaagacc catatatcac aaacaaaatt gaatctaata tattgaaata catactttg 11280  
 atccttaata aaagaactgg aactttaatt tacaaaactt attcaatag attattggat 11340  
 cccaatacta taaccactt tttgggaatg tttttcata gatgttacgg atttctcct 11400  
 actactcaag gatcctttac ctctgaaatt tacattgtct gtcaatatcc aaagacactt 11460  
 gactctaca gcaaaacaga gttaacctat actagtttat ttaatattha tcagaacata 11520  
 agagtgatgg aaacttatca aatgaattt gatagagcat gtagtttatt gttttctgat 11580  
 atgacggaag gtcttattga taaaacacca ttttagatc ctgaagaatt ggctattttc 11640  
 ctgacaacag tgggattgga tacggggggtg gctttactaa tagcagaaca attacagata 11700  
 tcttgctcaa acaaattaca tccaataatc atattatgga ttttaggctt tataatttcc 11760  
 agacacttag tgagtataac atcttggttt cgtagaggaa caaaattccc tccttctatc 11820  
 cagttgcaa aaatgtagc tgctctattt ggaatctggt atggagtctc ttatattatg 11880  
 aatgatgcag agagttactc aaggatttct gtattgtaca atcaagagat ttatttctca 11940  
 ttaggcttga ctaatgggt atataggaaa aaagatgaca tggaattggg tcaattttca 12000  
 acttgaaga taggacctgg tgataatagt aaactcatag atataggctc caaagcgggt 12060  
 ataactcaga caatgataag agctattgta gtcttgata aaggagaaca tataacttct 12120  
 atttgacta aggaagataa agtagaagga gatagaattt taagcttatt tggaaaagga 12180  
 ttgaatctta aaactttaat ggagcgaaca ggaataaatt attgcaat aggggaaaga 12240  
 aatcctcaag aaattccata tacgttagag gaagaagtat tggaagaagt ggtagaagaa 12300  
 aatacaggag aatttgatca atcataaaca gataaaggaa atraaaaaaa aaaaaatata 12360  
 tattgaaata ataaagctta aagaacaaga tcttgaatt gtgaactact aagtat 12416

<210> 14  
 <211> 513  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Virus Bahia Grande

<400> 14

Met Ala Ala Ala Ile Leu Pro Val Ser Arg Asn Met Pro Val Arg Glu  
 1            5            10            15

ES 2 551 892 T3

Arg Thr Val Ala Gly Ser Val Thr Ala Pro Pro Val Gln Tyr Pro Ser  
 20 25 30

Thr Trp Phe Gln Ala His Ala Gly Gln Lys Val Ser Ile Thr Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asn Thr Asn Ala Arg Gln Ala Phe Ser Arg Ile Thr Gln Leu Arg  
 50 55 60

Asn Asn Gly Gln Trp Asp Asp Lys Leu Ile Ala Thr Phe Met Lys Gly  
 65 70 75 80

Val Leu Asp Glu Asn Ala Glu Trp Phe Gln Ser Pro Pro Leu Ile Glu  
 85 90 95

Asp Trp Ile Val Asn Glu Ala Val Ile Gly Arg Val Asp Asp Val Val  
 100 105 110

Ala Pro Thr Ala Leu Ala Gln Trp Glu Glu Val Glu Arg Pro Gln Asn  
 115 120 125

Met Asp Pro Val Pro Asn Glu Glu Gly Glu Leu Gly Thr Arg Arg Ser  
 130 135 140

Phe Phe Leu Ala Leu Ile Thr Ile Tyr Arg Gln Val Leu Thr Arg Thr  
 145 150 155 160

Ile Asn Val Asp Tyr Gly Gln Glu Val Ser Arg Arg Ile Ile Asp Asn  
 165 170 175

Phe Lys Glu Gln Pro Leu Gly Met Ser Gln Asp Asp Ile Asn Glu Ile  
 180 185 190

Gln Gly Tyr Glu Ser Lys Glu Arg Leu Thr Thr Asn Tyr Val Lys Ile  
 195 200 205

Leu Cys Ile Leu Asp Met Phe Phe Asn Lys Phe Gln Thr His Asp Lys  
 210 215 220

Ser Thr Ile Arg Ile Ala Thr Leu Pro Thr Arg Tyr Arg Gly Cys Ala  
 225 230 235 240

Ala Phe Thr Ser Tyr Gly Glu Leu Ala Ile Arg Leu Gly Ile Glu Pro  
 245 250 255

Ile Lys Leu Pro Ser Leu Ile Leu Thr Val Ala Val Ala Lys Asp Phe  
 260 265 270

Asp Lys Ile Asn Val Asn Gly Glu Gln Ala Glu Gln Leu Asp Gly Tyr  
 275 280 285

Phe Pro Tyr Gln Leu Glu Leu Gly Leu Val Lys Lys Ser Ala Tyr Ser  
 290 295 300

Ala Gly Asn Cys Pro Ser Leu Tyr Leu Trp Met His Thr Ile Gly Thr  
 305 310 315 320

Met Leu His Gln Gln Arg Ser Tyr Arg Ala Asn Val Pro Lys Asn Val  
 325 330 335

Pro Asp Gln Met Gly Thr Ile Asn Ser Ala Ile Ala Val Ala Met Gln  
 340 345 350

Phe Val Ala Gly Gly Glu Phe Ser Met Gln Phe Val Gly Asp Ala Arg  
 355 360 365

Val Gln Glu Ala Met Arg Glu Met Gln Thr Ala Glu Ala Glu Leu Asn  
 370 375 380

Glu Leu Arg Met Ala Gln Ala Arg Glu Met Arg Ala Ala Ala Arg Gly  
 385 390 395 400

Asp Glu Asp Glu Glu Gly Ser Glu Asp Gly Leu Asp Asp Glu Asn Asp  
 405 410 415

Gly Glu Gly Asp Asp Glu Leu Pro Ala Glu Ile Glu Gln Asn Pro Glu  
 420 425 430

Tyr Leu Asn Arg Val Asn Arg Ile Arg Glu Leu Gln Glu Asn Leu Gln  
 435 440 445

Gln Tyr Asn Ala Thr Val Gln Gln His Thr Asn Ala Val Glu Lys Ala  
 450 455 460

ES 2 551 892 T3

Ala Leu Arg Ala Leu Ala Tyr Leu Gln Glu Asn Gly Gly Ile Ala Asp  
465                    470                    475                    480

Lys Asp Lys Arg Asp Leu Gly Ile Arg Phe Arg Arg Phe Ala Asp Glu  
                  485                    490                    495

Ala Glu Gly Arg Val Gly Lys Leu Leu Ala Ser Leu Phe Pro Ala Pro  
                  500                    505                    510

Arg

<210> 15  
<211> 353  
<212> PRT  
<213> Desconocido

5

<220>  
<223> Virus Bahia Grande

10

<400> 15

Met Ala Tyr Ser Thr Gly Leu Ile Lys Gly Glu Val Ser Gln Gly Leu  
1                    5                    10                    15

Ser Asn Ala Phe Lys Asp Ala Gly Ile His Gln Ile Glu Leu Asn Lys  
                  20                    25                    30

Glu Tyr Asp Asn Leu Ser Ile Leu Gly Ala Asn Met Ser Ala Leu Asn  
                  35                    40                    45

Lys Met Phe Asp Thr Glu Asp Glu Gly Leu Ser Asp Thr Asn Thr Asn  
                  50                    55                    60

Ser Ser Lys Asn Ser Ile Leu Gln Ala Ser Asp Met Phe Ile Gly Asn  
65                    70                    75                    80

Asp Glu Tyr Glu Ser Asp Asp Ser His His Phe Leu Ser Ser Pro Ser  
                  85                    90                    95

Pro Asp Lys Gly Ser Ser Glu Glu Gly Ser Asn Leu Gln Glu Phe Asn  
                  100                    105                    110

ES 2 551 892 T3

Phe Gln Ile Pro Arg Asn Lys Val Gly Lys Glu Lys Ala Tyr Arg Arg  
115 120 125

Gly Val Ile Asp Val Leu Asp Phe Leu Gln Arg His Arg Phe Ile Glu  
130 135 140

Glu Phe Arg Met Glu Gly Leu Asn Glu Asp Ile Val Cys Ile Ile Pro  
145 150 155 160

Thr Arg Gly Met Ile Pro Thr Lys Thr Pro Pro Thr Leu Asp Asp Lys  
165 170 175

Ile His Leu Ala Asn Asp Gln Ser Ile Glu Lys Glu Glu Ile Leu Gln  
180 185 190

Lys Asp Lys Thr Ser Lys Pro Asn Lys Gly Ile Lys Gln Pro Asn Lys  
195 200 205

Gln Glu Ala Gln Pro Val Ser Glu Ser Gln Thr Gly Met Lys Glu Asp  
210 215 220

Lys Lys Glu Gln Lys Pro Lys Gln Asn Gln Ile Pro Ile Lys Asn Lys  
225 230 235 240

Gln Glu Asn Glu Asp Ser Lys Glu Val Ala Lys Thr Asn Lys Asp Lys  
245 250 255

Glu Asn Lys Val Ser Lys Gly Ser Met Ser Lys Asn Asp Lys Leu Lys  
260 265 270

Glu Gly Asn Ile Thr Val Pro Lys Gln Gly Phe Glu Lys Lys Lys Thr  
275 280 285

Lys Gln Ile Asn Glu Glu Gly His Lys Ser Phe Asp Tyr Ala Asn Thr  
290 295 300

Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Lys Thr Ile Arg Tyr Cys Lys Thr Cys  
305 310 315 320

Asn Pro Asn Thr Arg Lys Asn Ala Thr Val Tyr Leu Asp His Leu Tyr  
325 330 335

Glu Arg His Ser His Glu Val Ala Leu Ile Lys Ser Leu Ala Tyr Pro  
 340 345 350

Leu

5 <210> 16  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Virus Bahia Grande

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (160)..(160)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 16

Met Ser Gly Val Met Ser Ile Phe Lys Arg Lys Asp Lys Lys Gly Asn  
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Lys Ala Leu Ala Ile Pro Asp Glu Lys Ser Val Val Pro  
 20 25 30

Ser Ala Pro Pro Asp Ile Ser Ala Met Asp Tyr Gly Arg Phe Gly Leu  
 35 40 45

Leu Gly Arg Gln Thr Leu Leu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Ser Arg Cys  
 50 55 60

Ile Thr Ile Ile Asp Leu Glu Val Asp Leu Gln Ile Glu Val Leu Ser  
 65 70 75 80

Asn Arg Glu Thr Arg Leu Val Ile Asp Leu Ile Ala Pro Leu Cys Asn  
 85 90 95

Leu Gln Thr Asp Tyr Ile Gly Lys Glu Asn Thr Lys Ala Ile Trp Ile  
 100 105 110

Gly Leu Thr Val Val Ala Ala Phe Gly Val Lys Arg Thr Ile Lys Thr  
 115 120 125

Lys Asn His His Val Tyr Lys Gly Cys Val Ser Ser Gly Leu Arg Leu  
 130 135 140

Leu Ile Asp Ser Glu Lys Gln Phe Glu Leu Asp Lys Arg Asn Lys Xaa  
 145 150 155 160

Ser Gln His Leu Ser Tyr Leu Thr Asn Gly Val Lys Thr Glu Trp Ala  
 165 170 175

Ile Arg Gly Glu Met Ile Arg Thr Arg Val Pro Tyr Leu Pro Gln Pro  
 180 185 190

Gly Ser Glu Asp Val Leu Met Phe Leu Ala Gly Met Gly Ile Ser Cys  
 195 200 205

Tyr Ser Asn Pro Asp Gly His Leu Val Leu Lys Val  
 210 215 220

<210> 17  
 <211> 591  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <223> Virus Bahia Grande

10

<400> 17

Met Ile Ser Asn Met Phe Phe Leu Phe Gln Leu Ser Leu Phe Leu Gln  
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Gly Asp Glu Ser Leu Glu Thr Ile Thr Ala Pro Glu Thr  
 20 25 30

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Lys Gly Asp Thr Lys Tyr Leu Phe Leu Val  
 35 40 45

Pro Ser Ser Val Lys Asn Trp Lys Pro Ala Asp Leu Asn Glu Leu Thr  
 50 55 60

Cys Pro Pro Leu Ile Ser Lys Pro Asp Thr Ser Glu Met Thr Tyr Phe  
 65 70 75 80

Ser Thr Asp Val Met Glu Leu Gln Lys His His Glu Leu Ala Pro Val  
 85 90 95

Glu Gly Tyr Leu Cys Ser Gly Leu Arg Tyr Lys Val Ile Cys Ser Glu  
 100 105 110

Gly Phe Phe Gly Gln Lys Thr Ile Ala Lys Lys Ile Glu Asn Ile Glu  
 115 120 125

Pro Asp Ser Lys Gln Cys Leu Asp Asp Leu Ser Lys Phe Lys Asn Asp  
 130 135 140

Asp Tyr Leu Leu Pro Tyr Phe Pro Ser Glu Asp Cys Asn Trp Met Lys  
 145 150 155 160

Glu Thr Pro Thr His Lys Asp Phe Ile Val Phe Gln Lys His Phe Val  
 165 170 175

Lys Tyr Asp Pro Tyr Asn Asn Gly Phe Tyr Asp Pro Leu Leu Lys Lys  
 180 185 190

Asp Tyr Cys Asp Thr Gln Val Cys Glu Thr Glu His Asp Gln Thr Ile  
 195 200 205

Trp Ile Thr Glu Lys Ser Ile Glu Asn Glu Cys Ile Phe Asn Tyr Pro  
 210 215 220

Ile Lys Lys His Ile Phe His Thr Ala Asp Phe Gly Lys Met Ile Ile  
 225 230 235 240

Asp Tyr Glu Leu Asn Gln Trp Thr Ser Val Glu Asp Gly Cys Leu Ile  
 245 250 255

Asn Tyr Cys Gly Arg Glu Gly Ile Arg Leu Ser Asn Gly Met Phe Phe  
 260 265 270

Val Gly Lys Phe Tyr Lys Asn Leu Asn Asn Leu Gln Thr Cys Ser Ala  
 275 280 285

Gly Thr Lys Val Ser Tyr Lys Pro Leu Thr Ser Lys Leu Glu Glu Ile  
 290 295 300

Glu Asn Glu Ile Ile Leu Asp Gln Glu Arg Leu Leu Cys Leu Asp Ser  
 305 310 315 320

Ile Arg Gln Met Thr Ala Thr Lys Lys Leu Ser Phe Tyr Ser Leu Ser  
 325 330 335

Phe Leu Glu Pro Lys Ser Ser Ser Arg His Lys Val Phe Arg Ile His  
 340 345 350

Asn Lys Thr Leu Glu Tyr Thr Glu Thr Glu Trp His Pro Ile Met Ser  
 355 360 365

Phe Asn Phe Asp Glu Pro Asn Lys Ile Gly Ile Asp Lys Asn Gly Lys  
 370 375 380

Ser Val Tyr Trp Asn Glu Trp Val Pro Ser Gly Ile Ser Gly Leu Leu  
 385 390 395 400

Ser Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Lys Glu Asn Glu Thr Lys Val Thr  
 405 410 415

Ile Ala Arg Leu Glu Thr Ile Lys Glu Asp Tyr Asp Arg Glu Met Met  
 420 425 430

Ile Asp His Glu Leu Val Glu Val Glu His Pro Lys Ile Val His Leu  
 435 440 445

Lys Arg Glu Asn Ile Thr Gly Ser Arg Val Glu Ile Val Asn Lys Glu  
 450 455 460

His Ser Asp Val Ser Gly Trp Leu Ser Ser Val Leu Ser Ser Phe Trp  
 465 470 475 480

Gly Lys Ile Met Met Thr Ile Ile Ser Ile Ile Leu Ile Val Ile Ile  
 485 490 495

Gly Leu Val Leu Ile Asn Cys Cys Pro Ile Ile Cys Lys Ser Cys Ile  
 500 505 510

Lys Arg Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Ser Arg Asn Arg His Arg Leu Asp  
 515 520 525

Arg Glu Asp Asn Gly Arg Leu Arg Arg Gln His Arg Val Ile Phe Asn  
 530 535 540

ES 2 551 892 T3

Asn Gln Ser Asn Asp Glu Glu Asn Ala Ile Glu Met Val Glu Tyr Thr  
 545 550 555 560

Asp Thr Pro Arg Pro Leu Arg Pro Ile Pro Asp Ala Thr Thr Ser Asp  
 565 570 575

Thr Glu Ser Arg Ser Pro Thr Thr Ala His Ser Phe Phe Asn Arg  
 580 585 590

<210> 18  
 <211> 2175  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Virus Bahia Grande

<400> 18

Met Asp Phe Ser Tyr Glu Gln Leu Leu Asp Pro Ile Asp Val Leu Glu  
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Tyr Glu Phe Asp Phe Glu Tyr Asp Asp Tyr Thr Asp Asp  
 20 25 30

Asp Gln Thr Pro Leu Pro Asn Ile Lys Tyr Lys Asn Leu Glu Gly Lys  
 35 40 45

Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp Val Ile Asp Ser Gly  
 50 55 60

Arg Glu Tyr Ile Ile Asn Ser Lys Lys Tyr Phe Ser His Glu Arg Thr  
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Leu Glu Gln Phe Ser Lys Ala Leu Met Ala Ile Gly Phe  
 85 90 95

Ser Arg Phe Asp Leu Arg Lys Ser Ser Glu His His Arg Tyr Met Ser  
 100 105 110

Ser Tyr Ile Tyr Gly Asn Glu Lys Lys His Met Lys Ile Glu Ile Ile  
 115 120 125

Pro Arg Trp Lys Glu Val Leu Glu Leu Thr Arg Asn Pro Val Glu Val  
 130 135 140

Thr Ser His Lys Ile Leu Gly Ser Lys Ser Gln Ser Asp Gln Glu Gly  
 145 150 155 160

Tyr Ile Asn Arg Leu Arg Tyr Ile Thr Val Asp Gly Pro His Ala Arg  
 165 170 175

Lys Thr Arg Leu His Gln Glu Trp Glu Lys Phe Ser Thr Leu His Tyr  
 180 185 190

Ile Thr Tyr Ile Met Asn Ser Lys Ala Phe Ser Asp Asn Lys Asn Trp  
 195 200 205

Val Arg Glu Val Phe Glu Thr Ile Glu Thr Ser Glu Val Asp Pro Glu  
 210 215 220

Ile Ile Thr Ile Ile Gly Thr Gly Leu Ser Lys Lys Glu Val Ser Trp  
 225 230 235 240

Ile Ile Ser Glu Asn Phe Ala Leu Asn Val Arg Thr Gly Leu Phe Val  
 245 250 255

Ser Lys Asp Phe Leu Leu Met Ile Lys Asp Val Thr Leu Ala Arg Cys  
 260 265 270

Met Ser Lys Leu Ser Met Ile Asn Arg Lys Ser Pro Asn Thr Thr Tyr  
 275 280 285

Asp Met Ile Lys Phe Leu Asp Ser Leu Tyr Glu Ser Gly Asp Lys Ile  
 290 295 300

Leu Thr Arg His Gly Asn Leu Ala Tyr Lys His Ile Lys Leu Leu Glu  
 305 310 315 320

Ala Ala Cys Leu Glu Arg Trp Asn Gln Leu Gly His Lys Phe Arg Pro  
 325 330 335

Leu Ile Pro Ile Ser Ser Ser Met Ser Asp His Leu Arg Thr Gln Leu  
 340 345 350

Glu Glu Asn Gln Asp Leu Tyr Met Val Ser Arg Glu Phe Phe Asp Leu  
 355 360 365

Ile Gly Lys Ile Glu Asp Pro Trp Val Val Ala Gln Ala Tyr Gly Thr  
 370 375 380

Phe Arg His Trp Gly His Pro Tyr Ile Asp Tyr Leu Asn Gly Leu Lys  
 385 390 395 400

Asp Leu Glu Lys Arg Val Asn Glu Asn Ile Lys Ile Asp Lys Asn Tyr  
 405 410 415

Ala Glu Lys Leu Ala Ser Asp Leu Ala Phe Ile Val Leu Lys Asp Gln  
 420 425 430

Phe Gly Lys His Lys Arg Trp Phe Ala Lys Pro Asn Lys Glu Leu Asp  
 435 440 445

Glu Asn Asn Pro Met Arg Lys Cys Ile Glu Asn Asn Val Trp Pro Asn  
 450 455 460

Thr Lys Val Ile Leu Asp Phe Gly Asp Asn Trp His Lys Leu Glu Leu  
 465 470 475 480

Leu Pro Cys Phe Glu Ile Pro Asp Ala Ile Asp Leu Ser Asp Leu Tyr  
 485 490 495

Ser Asp Lys Ala His Ser Met Gln Tyr Ser Glu Val Leu Asn Tyr Val  
 500 505 510

Lys Tyr Lys Lys Ser Lys Lys Asn Ile Pro Ala Leu Arg Val Ile Gly  
 515 520 525

Thr Leu Leu Glu Lys Glu Asn Pro Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Lys  
 530 535 540

Ile Asn Asp Glu Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys  
 545 550 555 560

Ala Lys Glu Arg Glu Leu Lys Asp Lys Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met  
 565 570 575

ES 2 551 892 T3

Ser Trp Asn Ile Arg Leu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys  
580 585 590

Leu His Phe Val Pro Leu Phe Ser Gly Leu Thr Val Ala Asp Asp Leu  
595 600 605

Asn Thr Val Thr Lys Lys Leu Leu Ser Ala Thr Glu Gly Gln Gly Leu  
610 615 620

Asp Asp Tyr Glu Arg Val Tyr Ile Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Glu Lys  
625 630 635 640

Trp Asn Asn Arg Gln Arg Tyr Glu Ser Asn Glu Pro Val Phe Thr Val  
645 650 655

Met Gly Lys Phe Leu Gly Tyr Pro Asn Leu Ile Ser Tyr Thr His Lys  
660 665 670

Ile Phe Glu Arg Ser Phe Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Leu Asp Leu Met  
675 680 685

Gly Val Asp Gly Tyr His Ile Tyr Asn Leu Phe Asp Asp Lys Met Val  
690 695 700

Cys Trp His Gly Gln Leu Gly Gly Phe Glu Gly Val Arg Gln Lys Gly  
705 710 715 720

Trp Ser Val Leu Asn Tyr Leu Ile Leu Arg Arg Glu Ala Ala Thr Arg  
725 730 735

Asn Thr Ala Pro Lys Phe Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Ile Val Ile  
740 745 750

Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ser Lys Ser Thr Gln Ala Ile Ile Glu Arg  
755 760 765

Glu Leu Arg Asn Ile Trp Glu Asn Asn Ala His Ile Met His Arg Ile  
770 775 780

Gln Gln Ala Thr Ser Arg Ile Gly Leu Val Ile Asn Asn Asp Glu Val  
785 790 795 800

Leu Thr Ser Ala Glu Leu Leu Val Tyr Gly Lys Ile Pro Val Phe Arg  
 805 810 815

Gly Lys Leu Leu Pro Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Ser Thr  
 820 825 830

Val Thr Asn Glu Gln Ile Pro Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ser  
 835 840 845

Thr Thr Thr Ala Leu Ala Val Asn Gln His Ser Glu Asn Pro Ile Glu  
 850 855 860

Val Ile Ser Gln His His Phe Phe Ser Ser Phe Ala Gly Thr Leu Val  
 865 870 875 880

Thr Phe Val Asn Pro Ile Leu Gly Phe Asp Pro Ile Lys Tyr Ser Gln  
 885 890 895

Leu Ser Glu Arg Asn Lys Lys Leu Phe Leu Leu Arg Leu Ile Tyr Lys  
 900 905 910

Asp Pro Ser Val Gly Gly Val Cys Gly Thr Asn Leu Leu Arg Phe Phe  
 915 920 925

Ile Ser Arg Phe Pro Asp Pro Leu Thr Glu Thr Leu Thr Trp Trp Lys  
 930 935 940

Ile Leu Val Glu Asn Ser Lys Asp Lys Glu Val Val Lys Ile Ala Leu  
 945 950 955 960

Glu Cys Gly Asn Pro Lys Phe Gly Gly Ile Asn Asp Lys Thr Leu Ala  
 965 970 975

Met Leu Leu Glu Asp Pro Met Ser Leu Asn Ile Pro Gly Gly Leu Ser  
 980 985 990

Ser Asp Thr Met Ile Lys Asn Lys Ile Tyr Glu Gly Leu Ile His Gln  
 995 1000 1005

Met Gly Leu Lys Leu Ile Lys Asn Glu Leu Val Val Glu Ser Leu  
 1010 1015 1020

Thr Phe Tyr Asn Asp Tyr Lys Ala Gln Phe Val Arg Trp Leu Phe  
 1025 1030 1035

Ser Ile Arg Pro Ile Phe Pro Arg Phe Ile Ser Glu Phe Tyr Thr  
 1040 1045 1050

Ser Thr Tyr Phe Tyr Ile Thr Glu Ser Val Leu Ala Ile Phe Gln  
 1055 1060 1065

Asn Ser Arg Thr Ile Arg Lys Val Phe Ser Lys Arg Phe Pro Lys  
 1070 1075 1080

Glu Val Tyr Leu Thr Ile Val Lys Gly Glu Gln Met Ser Ile Asp  
 1085 1090 1095

Ser Leu Leu Thr Thr Lys Arg Gly Ile Val Arg Glu Ala Ile Trp  
 1100 1105 1110

Lys Cys Ser Ala Thr Lys Ala Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Trp  
 1115 1120 1125

Gly Arg Asp Met Val Gly Ile Thr Thr Pro His Pro Ala Glu Phe  
 1130 1135 1140

Thr Gln Glu Leu Leu Cys Ser Asp Gly Cys Ser Glu Pro His Ile  
 1145 1150 1155

Val Ala Lys Lys Val Ile Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Trp Thr Lys  
 1160 1165 1170

Gly Lys Met Met Pro Tyr Leu Gly Thr Lys Thr Lys Glu Ser Thr  
 1175 1180 1185

Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Lys Arg Leu Glu Ile Pro Leu Leu  
 1190 1195 1200

Arg Lys Ala Cys Asp Leu Arg Lys Ala Ile Arg Trp Phe Val Glu  
 1205 1210 1215

Asp Asn Ser Asn Leu Ala Lys Ser Ile Tyr Lys Asn Leu Glu Ser  
 1220 1225 1230

Met Thr Gly Ile Asp Leu Arg Glu Glu Leu Arg Asn Tyr Lys Arg  
 1235 1240 1245

Thr Gly Ser Ser Lys His Arg Leu Arg Asn Ser Arg Val Ser Asn  
 1250 1255 1260

Glu Gly Asn Pro Ala Ile Gly Tyr Asn Asn Leu Thr Tyr Val Thr  
 1265 1270 1275

Val Thr Thr Asp Ser Leu Gly Asn Ile Asn Ser Glu Asn Tyr Asp  
 1280 1285 1290

Phe Met Tyr Gln Ser Ile Leu Cys Trp Cys Gly Val Leu Ser Ser  
 1295 1300 1305

Leu Ala Thr Asn Arg Tyr Arg Asp His Glu Thr Thr His Phe His  
 1310 1315 1320

Leu Lys Cys Asn Asp Cys Phe Arg Leu Val Lys Glu Glu Ile Leu  
 1325 1330 1335

Glu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Phe Pro Asn Val Arg Ser Ser Val  
 1340 1345 1350

Arg Arg Met Leu Thr Gln Asp Ile Lys Leu Lys Tyr Leu Pro Arg  
 1355 1360 1365

Ile Ser Ala Pro Asp Glu Asn Thr Trp Asp Thr Leu Asp Val Asp  
 1370 1375 1380

Gln Lys Ser Trp His Ile Gly Arg Ala Gln Gly Phe Leu Trp Gly  
 1385 1390 1395

Leu Asn Val Phe Thr Lys Thr Thr Lys Glu Val Glu Gly Asp Ile  
 1400 1405 1410

Phe Pro Thr Ser Ile Thr Lys Lys Val Glu Pro Glu Asn Tyr Met  
 1415 1420 1425

Asp Gly Leu His Arg Gly Phe Cys Leu Gly Ala Thr Leu Ser Pro  
 1430 1435 1440

Met Tyr Thr Arg Tyr Gly Ser Leu Ser Arg Met Ala Arg Arg Lys  
 1445 1450 1455

Phe Glu Gly Ala Tyr Trp Glu Ile Val Asp Glu Ala Met Lys Thr  
 1460 1465 1470

Asn Leu Pro Asn Met Ile Asp His Lys Asn Phe Lys Pro Phe Leu  
 1475 1480 1485

Arg Arg Thr Gly Gly Asp Leu Ile Lys Ser Tyr Pro Ala Arg Lys  
 1490 1495 1500

Glu Glu Leu Val Leu Val Leu Lys Lys Trp Phe Leu His Lys Met  
 1505 1510 1515

Val Ser Glu Arg Lys Asn Asn Ser Ile Trp Glu Ser Lys Arg Val  
 1520 1525 1530

Ile Ala Phe Ala Asp Met Asp Thr Glu Phe Val Leu Cys Leu Phe  
 1535 1540 1545

Arg Leu Ala Glu Ser Ile Leu Asn Cys Tyr Gln Asn Glu Ala Leu  
 1550 1555 1560

Ser Ala Gly Gln Ala Arg Val Leu Gly Asn Ala Lys Glu Thr Ile  
 1565 1570 1575

Asp Leu Ile Ser Lys Tyr Asn Asn Ser Asn Ile Asn Ala Asp Glu  
 1580 1585 1590

Ile Glu Arg Leu Gln Gln Ile Leu Met Ala Ser Asp Leu Lys Asp  
 1595 1600 1605

His Glu Val Val Asp Ser Gln Ala Arg His Ala Ala Ser Asp Leu  
 1610 1615 1620

Pro Glu Leu Ala Lys Ser Glu Asn Tyr Asn Glu Val Ile Lys Tyr  
 1625 1630 1635

Val Glu Phe Arg Gly Tyr Gly Gly Lys Thr Ile Arg Leu Glu Tyr  
 1640 1645 1650

Gln Pro Ser Asp Leu Ile Asp Trp Lys Gly Gly Met Val Gln Asp  
 1655 1660 1665

Leu Gln Val Pro Arg Leu Lys Asn Pro Leu Ile Ser Gly Val Arg  
 1670 1675 1680

Val Val Gln Tyr Ser Thr Gly Ala His Tyr Lys Tyr Lys Asp Ile  
 1685 1690 1695

Glu Arg Glu Phe Gln Ile Ala Gly Asp Gly Ile Phe Ala Gly Asp  
 1700 1705 1710

Gly Ser Gly Gly Met Gly Ala Asn His Leu Arg Leu His Lys Ser  
 1715 1720 1725

Ala Arg Val Ile Phe Asn Ser Lys Leu Glu Leu Glu Gly Glu Ser  
 1730 1735 1740

Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Gly Pro Gly Ala Tyr Thr Val Ser  
 1745 1750 1755

Gly Glu Asp Val Val Glu Arg Cys Val Asn Tyr Thr Thr Cys Trp  
 1760 1765 1770

Glu Glu Ala Ser Asp Leu Ser Asp Glu Lys Thr Trp Lys Asn Phe  
 1775 1780 1785

Phe Arg Leu Ile Lys Glu Tyr Ser Leu Asp Ile Glu Val Phe Cys  
 1790 1795 1800

Cys Asp Ala Glu Val Gln Asp Pro Tyr Ile Thr Asn Lys Ile Glu  
 1805 1810 1815

Ser Asn Ile Leu Lys Tyr Ile Ser Leu Ile Leu Asn Lys Arg Thr  
 1820 1825 1830

Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Phe Asn Arg Leu Leu Asp Pro  
 1835 1840 1845

Asn Thr Ile Thr His Phe Leu Gly Met Phe Phe His Arg Cys Tyr  
 1850 1855 1860

Gly Phe Leu Pro Thr Thr Gln Gly Ser Phe Thr Ser Glu Ile Tyr  
 1865 1870 1875

Ile Val Cys Gln Tyr Pro Lys Thr Leu Asp Ser Thr Ser Lys Thr  
 1880 1885 1890

Glu Leu Thr Tyr Thr Ser Leu Phe Asn Ile Tyr Gln Asn Ile Arg  
 1895 1900 1905

Val Met Glu Thr Tyr Gln Asn Glu Phe Asp Arg Ala Cys Ser Leu  
 1910 1915 1920

Leu Phe Ser Asp Met Thr Glu Gly Leu Ile Asp Lys Thr Pro Phe  
 1925 1930 1935

Leu Asp Pro Glu Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Val Gly Leu  
 1940 1945 1950

Asp Thr Gly Trp Ala Leu Leu Ile Ala Glu Gln Leu Gln Ile Ser  
 1955 1960 1965

Cys Ser Asn Lys Leu His Pro Ile Ile Ile Leu Trp Ile Leu Gly  
 1970 1975 1980

Phe Ile Ile Ser Arg His Leu Val Ser Ile Thr Ser Trp Phe Arg  
 1985 1990 1995

Arg Gly Thr Lys Phe Pro Pro Ser Ile Gln Leu Gln Lys Met Leu  
 2000 2005 2010

Ala Ala Leu Phe Gly Ile Trp Tyr Gly Val Ser Tyr Ile Met Asn  
 2015 2020 2025

Asp Ala Glu Ser Tyr Ser Arg Ile Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu  
 2030 2035 2040

Ile Tyr Phe Ser Leu Gly Leu Thr Asn Met Val Tyr Arg Lys Lys  
 2045 2050 2055

Asp Asp Met Glu Leu Gly Gln Phe Ser Thr Trp Lys Ile Gly Pro  
 2060 2065 2070

Gly Asp Asn Ser Lys Leu Ile Asp Ile Gly Pro Lys Ala Gly Ile  
 2075 2080 2085

Thr Gln Thr Met Ile Arg Ala Ile Val Val Leu Tyr Lys Gly Glu  
 2090 2095 2100

His Ile Thr Ser Ile Val Thr Lys Glu Asp Lys Val Glu Gly Asp  
 2105 2110 2115

Arg Ile Leu Ser Leu Phe Gly Lys Gly Leu Asn Leu Lys Thr Leu  
 2120 2125 2130

Met Glu Arg Thr Gly Ile Asn Tyr Leu Gln Ile Gly Glu Arg Asn  
 2135 2140 2145

Pro Gln Glu Ile Pro Tyr Thr Leu Glu Glu Glu Val Leu Glu Glu  
 2150 2155 2160

Val Val Glu Glu Asn Thr Gly Glu Phe Asp Gln Ser  
 2165 2170 2175

<210> 19

<211> 519

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Isf-VSV quimérico

10

<400> 19

Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu  
 20 25 30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala  
 35 40 45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys  
 50 55 60

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His  
 65 70 75 80

Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys  
                   85                  90                  95

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys  
           100                  105                  110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly  
           115                  120                  125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe  
           130                  135                  140

Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg  
   145                  150                  155                  160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn  
           165                  170                  175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu  
           180                  185                  190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser  
           195                  200                  205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu  
           210                  215                  220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met  
   225                  230                  235                  240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile  
           245                  250                  255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu  
           260                  265                  270

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser  
           275                  280                  285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr  
           290                  295                  300

Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Glu Lys Ile Asp Arg Lys Glu Pro Leu  
 305                    310                    315                    320

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly  
                   325                    330                    335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg  
                   340                    345                    350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly  
                   355                    360                    365

Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp  
                   370                    375                    380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr  
 385                    390                    395                    400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val  
                   405                    410                    415

Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro  
                   420                    425                    430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe  
                   435                    440                    445

Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly  
                   450                    455                    460

Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Thr Ile  
 465                    470                    475                    480

Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile Tyr Leu  
                   485                    490                    495

Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile  
                   500                    505                    510

Glu Met Asn Arg Leu Gly Thr  
 515

ES 2 551 892 T3

<212> ADN  
 <213> Desconocido

5 <220>  
 <223> Virus Maraba

<400> 20

atgaaaaaaaa ctaacagggt tcaaacactc ttgatcgagg tattgagact ttttctcttt 60  
 tgtttcttgg ccttaggagc ccaactccaaa ttactatag tattccctca tcatcaaaaa 120  
 ggggaattgga agaatgtgcc ttccacatat cattattgcc ctctagttc tgaccagaat 180  
 tggcataatg atttgactgg agttagtctt catgtgaaaa ttcccaaaag tcacaaagct 240  
 atacaagcag atggctggat gtgccacgct gctaaatggg tgactacttg tgacttcaga 300  
 tggtagcgac ccaaatacat cacgcattcc atacactcta tgcacccac ctagaacag 360  
 tgcaagacca gtattgagca gacaaagcaa ggagtttga ttaatccagg ctttccccct 420  
 caaagctgcg gatatgctac agtgacggat gcagaggtgg ttgttgata agcaacacct 480  
 catcatgtgt tggttgatga gtacacagga gaatggattg actcacaatt ggtggggggc 540  
 aatgttcca aggaggttg tcaaacggtt cacaactcga ccgtgtggca tgctgattac 600  
 aagattacag ggctgtgca gtcaaatctg gcatcagtgg atatcacctt cttctctgag 660  
 gatggtcaaa agacgtcttt gggaaaaccg aacactggat tcaggagtaa ttactttgct 720  
 tacgaaagtg gagagaaggc atgccgatg cagtactgca cacaatgggg gatccgacta 780  
 cttctggag tatggttga attagtggac aaagatctct tccaggcggc aaaattgctt 840  
 gaatgtccta gaggatccag tatctcagct cttctcaga cttctgtgga tgttagtttg 900  
 atacaagacg tagagaggat cttagattac tctctatgcc aggagacgtg gagtaagata 960  
 cgagccaagc ttctgtatc tccagtagat ctgagttatc tcgccccaaa aaatccaggg 1020  
 agcggaccgg cttcactat cattaatggc actttgaaat atttcgaaac aagatacatc 1080  
 agagttgaca taagtaatcc catcatcctt cacatggtgg gaacaatgag tggaaccaag 1140  
 actgagcgtg aattgtggaa tgattggtat ccatatgaag acgtagagat tggccaat 1200  
 ggggtgttga aaactccac tggttcaag tttccgctgt acatgattgg gcacggaatg 1260  
 ttggattccg atctccacaa atctccacag gctcaagtct tcgaacatcc acacgcaaag 1320  
 gacgctgcat cacagcttc tgatgatgag actttatctt ttggtgacac aggactatca 1380

aaaaaccag tagagttagt agaaggctgg ttcagtagct ggaagagcac attggcatcg 1440  
 ttctttctga ttataggctt gggggtgca ttaatcttca tcattcgaat tattgttgcg 1500  
 attcgatcac gaattctgga tccgatacgt aacgctctgc agctgctgggt tgcattaatc 1560  
 ttcatcattc gaattattgt tgcgattcgc tataaataca aggggaggaa gacccaaaaa 1620  
 atttacaatg atgtcgagat gagtgcgattg ggaaataaat aa 1662

5 <210> 21  
 <211> 518  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
  
 10 <220>  
 <223> Virus Muir Spring  
  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (384)..(384)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (386)..(386)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (389)..(390)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
  
 <400> 21

Met Lys Tyr Pro Val Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Gln Ile Leu Leu Lys  
 1 5 10 15

Trp Asn Thr Cys Leu Leu Met Ser Trp Asn Ser Gln Lys His His Glu  
 20 25 30

Leu Ala Pro Val Gln Gly Tyr Leu Cys Ser Gly Leu Arg Tyr Lys Val  
 35 40 45

Ile Cys Ser Glu Gly Phe Phe Gly Gln Lys Thr Ile Thr Lys Lys Ile  
 50 55 60

Glu Asn Leu Glu Pro Asp Gln Asn Lys Cys Val Gln Asp Leu Glu Lys  
 65 70 75 80

Phe Ile Asn Asp Asp Tyr Leu Leu Pro Tyr Phe Pro Ser Glu Asp Cys  
 85 90 95

Asn Trp Met Lys Glu Thr Pro Val His Gln Asp Phe Ile Val Tyr Gln  
 100 105 110

Lys His Gln Val Lys Tyr Asp Pro Tyr His Asn Gly Phe Tyr Asp Ala  
 115 120 125

Leu Phe Lys Lys Asp Phe Cys Gln Glu Lys Ile Cys Glu Thr Glu His  
 130 135 140

Asp Gln Thr Ile Trp Ile Thr Asn Gln Glu Leu Lys Gln Glu Cys Thr  
 145 150 155 160

Phe Asn Tyr Pro Val Lys Lys His Val Phe Tyr Lys Arg Asp Tyr Ser  
 165 170 175

Lys Met Ile Ile Asp Tyr Glu Ile Asn Gln Trp Thr Ser Val Glu Asp  
 180 185 190

Gly Cys Leu Ile Arg Tyr Cys Gly Gln Glu Gly Ile Arg Leu Ser Asn  
 195 200 205

Gly Met Phe Phe Val Gly Lys Phe Tyr Lys Leu Ile Ser Asn Leu Pro  
 210 215 220

Ile Cys Pro Glu Gly Thr Lys Ile Ser Tyr Lys Pro Ile Lys Ala Gln  
 225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Glu Asn Glu Ile Ile Leu Asn Gln Glu Arg Leu Leu  
 245 250 255

Cys Leu Asp Ser Ile Arg Gln Met Thr Ala Ser Lys Lys Leu Ser Phe  
 260 265 270

Tyr Ser Leu Ser Phe Leu Glu Pro Lys Ser Met Ser Arg His Lys Val  
 275 280 285

Tyr Arg Ile His Asn Asn Thr Leu Glu Tyr Thr Glu Thr Glu Trp Glu  
 290 295 300

Pro Ile Val Ala Phe Asn Phe Asn Gly Lys Asn Gln Ile Gly Val Asn  
 305 310 315 320

Lys Glu Gly Lys Glu Val Tyr Trp Asn Glu Trp Val Pro Ser Gly Lys  
 325 330 335

Asp Gly Leu Leu Ser Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Lys Val Asn Ser  
 340 345 350

Ser Lys Ile Ser Ile Ser Arg Leu Glu Thr Ile Lys Glu Asp Tyr Glu  
 355 360 365

Arg Glu Met Met Ile Asp His Glu Leu Val Thr Val Glu His Pro Xaa  
 370 375 380

Ile Xaa His Leu Xaa Xaa Glu Asn Ile Thr Gly Ser Arg Val Glu Ile  
 385 390 395 400

Val Asn Thr Glu His Ser Asp Val Ser Gly Trp Phe Ser Ser Val Leu  
 405 410 415

Lys Ser Phe Trp Gly Lys Leu Met Met Thr Val Val Ser Ile Ile Ile  
 420 425 430

Ile Ile Ile Ile Gly Leu Leu Ile Ile Asn Cys Gly Pro Ile Ile Cys  
 435 440 445

Lys Thr Cys Ile Ser Ser Tyr Lys Lys Lys Lys Ser Arg Arg Asp Arg  
 450 455 460

Phe Arg Ala Asp Arg Glu Thr Glu Thr Gly Leu Arg Arg Gln His Arg  
 465 470 475 480

Val Val Phe His Asn Asn Glu Thr Asp Asp Glu Arg Ala Ile Glu Met  
 485 490 495

Thr Gly His His Phe Gly Lys His Val Arg Ser Glu Leu Arg Pro Arg  
 500 505 510

Arg His Pro Gly Ser Gly  
 515

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

5 <223> Virus Muir Spring

<400> 22

gcggcggggg ctggccatca ctttggaag cacgtgagat ctgattcgcg gccgcgtcga 60  
cgcccctgaa actcctgac ctatcctct ccaaggagat aaaacttacc tcttttagt 120  
cccttcagag agcaaaaatt ggaaaccgc agatcttaat gaagatcct gtcctcctct 180  
tatatcaaaa ccagatactg ctgaaatgga atacatgtct actgatgtca tggaactcgc 240  
aaaaacatca tgaactcgcg cctgtgcaag ggtatttatg ttctggctta agatataaag 300  
ttattgttc tgaaggattc ttggacaaa aaacaataac taagaaaatt gaaaatcttg 360  
aacctgatca gaacaaatgt gttcaagatt tagaaaagtt tattaatgac gattatttgc 420  
tacctatct cccatcagaa gattgtaatt ggatgaaaga aacaccagtt catcaagatt 480  
tcatagtta ccaaaaacat caggttaaat atgatccata ccacaatggc tttacgatg 540  
ctctgtcaa gaaagatttt tgtcaagaga aaatatgtga gacagagcat gatcagacaa 600  
tatggataac taaccaagaa ttaaacaag aatgcacttt taattatccg gtaaaaaaac 660  
atgtattcta taagagagat tatagcaaaa tgatcatcga ttatgaaatc aaccaatgga 720  
cttcagttga ggatggatgt ttgataagat attgtgtcga ggaaggaatt agattatcta 780  
atgggatggt cttttagga aaattttaca aattaatc gaatctgcca attgtccag 840  
aaggaacca gatcagctac aagccatta aagcacaatt agatgaaata gaaatgaaa 900  
taattttaaa tcaagaaaga cttttatggt tagattctat acgacaaatg actgcttcta 960  
aaaaattacc ttttattca ttatcctct tggagcctaa atccatgagt agacataagg 1020  
tctatagaat tcacaataat actttagaat aactgaaac tgaatgggaa cctatagtgg 1080  
cttttaattt taatggaaag aatcaaatcg gagtaaataa agaaggggaag gaagtttatt 1140  
ggaatgaatg ggtgccaggt ggaaaagatg gattgctctc aggattcaat ggagtttata 1200  
agaaagttaa ttcttcaaaa atttcaatat caagattaga aaccattaaa gaagattatg 1260  
aaagagaaat gatgatagat catgaattgg ttacagttga gcatcctama attgkccatc 1320  
ttaawasaga aaacatmaca ggttctagag tggagatagt taatactgaa cattcagacg 1380

tcagtgggtg gttctcatct gttttaaaga gttttgggg aaagttgatg atgactgttg 1440  
 tcagtataat aataattatc atcataggcc tattgattat caattgtggt ccaattatct 1500  
 gtaaaacttg cattagcagc tataaaaaga aaaagagtag aagagataga tttagagcag 1560  
 atagagaaac tgaactgga ctgcgtcgac aacatagagt ggtatttcat aataatgaaa 1620  
 cagatgatga aagagcaata gagatgactg gccatcactt tggcaagcac gtgagatctg 1680  
 aattgcggcc gcgtcgacat cctggctcag gatgaacgct ggctgtgtgc ctaatacatg 1740  
 catgtcgagc gaggttcttt tgaacctagc ggcgaatggg tgagtaacac gtgcttaatc 1800  
 taccctttag attggaatac ccaatggaaa cattggctaa tgccggatac gcatggaatc 1860  
 gcatgattcc gttgtgaaag gagcctttaa agctccgcta gaggatgagg gtgcggaaca 1920  
 ttagttagtt ggtagggtaa tggcctacca agactatgat gtttagccgg gtcgagagac 1980  
 tgaacggcca cattgggact gagatacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga 2040  
 atattccaca atgagcgaaa gcttgatgga gcgacacagc gtgcacgatg aaggtcttcg 2100  
 gattgtaaag tgctgttata gggaaagaac acctggttga ggaaatgctt ccaggctgac 2160  
 ggtaccctgt cagaaagcga tggctaacta tgtgccagca gccgcggtaa tacataggtc 2220  
 gcaagcgta tccggaatta ttgggcgt 2248

5 <210> 23  
 <211> 1948  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> VSV

<400> 23

acgcgttttc gccaccatgc cgaagcgcgc cgctggattc cgaaaggct ggtacgcgcg 60  
 gcagaggaac tcctgacgc atcaaatgca acgcatgacg ctgagcgaic ccacgagtga 120  
 gctgcccacc cagaggcaaa ttgaagcgtc aatgcgctac gcttggatg aggcacatgt 180  
 acaacctccg gtgacaccta ctaacatctt gatcatgtta ttattattgt tacagcgggt 240  
 acaaaatggg gcagctgcgg cttttgggc gtacattcct gatccgcaa tgattcaatc 300  
 cttaggatgg gatagagaaa tagtaccgt atagttaat gatacgagcc ttttaggagg 360  
 aaaatcagat attcacattt cccctcagca agcaaatatc tcttttatg gccttaccac 420  
 tcaatatccc atgtgctttt cttatcaatc gcagcatcct cattgtatac aggtatcagc 480

tgacatatca tatectcgag tgactatctc aggcattgat gaaaaaactg ggaaaaaatc 540  
 atacgggaac ggatctggac cctcgcacat tccgttttgt gacaagcatt taagcattgg 600  
 cataggcata gacactcctt ggactttatg tcgagcccgg gtcgcgtcag tatataacat 660  
 caataatgcc aatgccacct ttttatggga ttgggcacct ggaggaacac ctgattttcc 720  
 tgaatatcga ggacagcadc cgcctatttt ctctgtgaat accgctccaa tataccaaac 780  
 ggaactatgg aaacttttgg ctgcttttgg tcatggcaat agtttatatt tacagcccaa 840  
 tatcagtgga agcaaatatg gtgatgtagg agttacagga ttttatatc ctcgagcttg 900  
 cgtgccgtat ccattcatgt tgatacaagg ccatatggaa ataacactgt cattaatat 960  
 ttatcatttg aattgttcta atgcatact gactaattgt atcaggggag tagccaaagg 1020  
 agaacaggtt ataatagtaa aacagcctgc ctttgaatg ctgcccgttg aaatagctga 1080  
 agcctggat gatgaaactg ctttagaatt attacaacgc attaatacgg ctcttagccg 1140  
 ccctaagaga ggctgagcc tgattattct gggtagtagta tctttaatca ccctcatagc 1200  
 tacagctgtt acggcttccg tatctttagc acagtctatt caagctgccc acacggtaga 1260  
 ctcttatca tataatgta ctaaagtat ggggacccaa gaagatattg ataaaaaat 1320  
 agaagatagg ctatcagctc tatatgatgt agtcagagtc ttaggagagc aagttcagag 1380  
 cattaatttt cgatgaaaa tccaatgtca tgctaactat aatggattt gtgttacaaa 1440  
 aaaaccatac aacacttctg attttccatg ggacaaagtg aagaaacatt tgcaaggaat 1500  
 ttggttcaat actaatctat cgtagacct ttacaactg cataatgaga ttcttgatat 1560  
 tgaaaattcg ccgaaggcta cactaaatat agccgatact gttgataatt tcttgcaaaa 1620  
 tttattctct aatttcccta gtctccattc gctgtggaaa accctgattg gtgtaggaat 1680  
 acttggtttt attataattg tcgtaatcct tatatttctt tgccctgtac gtagtagttg 1740  
 gaagagctct attgcctctt tttctttac cataggggta atcattggac tattcttgg 1800  
 tctccgagtt ggtatttatc ttgcattaa attaaagcac accaagaaaa gacagattta 1860  
 tacagacata gagatgaacc gacttggaaac gtaactcaaa tcctcgaggc taggtatgaa 1920  
 aaaaactaac agatatcacg gctagcgg 1948

5

- <210> 24
- <211> 2031
- <212> ADN
- <213> Desconocido
  
- <220>
- <223> virus del Ébola

&lt;400&gt; 24

atgggcgta caggaatatt gcagttacct cgtgatcgat tcaagaggac atcattcttt 60  
ctttgggtaa ttatcctttt ccaaagaaca ttttccatcc cacttggagt catccacaat 120  
agcacattac aggttagtga tgcgacaaa ctagtttgc gtgacaaact gtcacccaca 180  
aatcaattga gatcagttgg actgaatctc gaagggaatg gagtggcaac tgacgtgcca 240  
tctgcaacta aaagatgggg cttcaggtcc ggtgtcccac caaagtggt caattatgaa 300  
gctggtgaat gggctgaaaa ctgtacaat cttgaaatca aaaaacctga cgggagtgag 360  
tgtctaccag cagcgcaga cgggattcgg ggcttcccc ggtgccgga tgtgcacaaa 420  
glatcaggaa cgggaccgtg tgccggagac tttgccttcc ataaagagg tgctttcttc 480  
ctgtatgatc gacttgctc cacagttatc taccgaggaa cgactttcgc tgaagggtgc 540  
gttgcatcctc tgatactgcc ccaagctaag aaggacttct tcagtcaca ccccttgaga 600  
gagccggta atgcaacgga ggaccctct agtggctact attctaccac aattagatat 660  
caggctaccg gttttggaac caatgagaca gactactgt tcgaggtga caattgacc 720  
tacgtccaac ttgaatcaag attcacacca cagtttctgc tccagctgaa tgagacaata 780  
tatacaagtg ggaaaaggag caataccacg ggaaaactaa tttggaaggt caaccccgaa 840  
attgatacaa caatcgggga gtggccttc tgggaaacta aaaaaaacct cactagaaaa 900  
attcgcagtg aagagttgc tttcacagtt gatatcaacg gagccaaaaa catcagtggt 960  
cagagtccg cgcgaacttc ttcgaccca gggaccaaca caacaactga agaccacaaa 1020  
atcatggctt cagaaaattc ctctgcaatg gttcaagtgc acagtcaagg aagggagct 1080  
gcagtgtgc atctaacaac ccttgccaca atctccacga gtcccaatc cctcacaacc 1140  
aaaccaggtc cggacaacag cacccataat acaccctgt ataaactga catctctgag 1200  
gcaactcaag ttgaacaaca tcaccgcaga acagacaacg acagcacagc ctccgacact 1260  
ccctctgcca cgaccgcagc cggaccccca aagcagaga acaccaaac gagcaagagc 1320  
actgacttcc tggacccgc caccacaaca agtcccaaaa accacagcga gaccgctggc 1380  
aacaacaaca ctatcacca agataccgga gaagagagt ccagcagcgg gaagctagc 1440  
ttaattacca atactattgc tggagtgcga ggactgatca caggcgggag aagaactcga 1500  
agagaagcaa ttgtcaatgc tcaacccaaa tgcaacccta atttacta ctggactact 1560

caggatgaag gtgctgcaat cggactggcc tggataccat atttcgggcc agcagccgag 1620  
 ggaattaca tagaggggct aatgcacaat caagatgggt taatctgtgg gttgagacag 1680  
 ctggccaacg agacgactca agctctcaa ctgttctga gagccacaac tgagctacgc 1740  
 acctttcaa tctcaaccg taaggcaatt gatttcttgc tgcagcgatg gggcggcaca 1800  
 tgccacattc tgggaccgga ctgctgtatc gaaccacatg attggaccaa gaacataaca 1860  
 gacaaaattg atcagattat tcatgatttt gttgataaaa cccttcgga ccagggggac 1920  
 aatgacaatt ggtggacagg atggagacaa tggataccgg caggtattgg agttacaggc 1980  
 gttataattg cagttatcgc tttattctgt atatgcaaat ttgtcttta g 2031

5 <210> 25  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador sintético

<400> 25  
 ctcgagggta tgaaaaaac taacagatat cacggctag 39

15 <210> 26  
 <211> 523  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

20 <220>  
 <223> Virus Isfahan

<400> 26

Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu  
 20 25 30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala  
 35 40 45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys  
 50 55 60

ES 2 551 892 T3

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His  
65                    70                    75                    80

Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys  
                  85                    90                    95

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys  
                  100                    105                    110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly  
                  115                    120                    125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe  
                  130                    135                    140

Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg  
145                    150                    155                    160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn  
                  165                    170                    175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu  
                  180                    185                    190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser  
                  195                    200                    205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu  
                  210                    215                    220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met  
225                    230                    235                    240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile  
                  245                    250                    255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu  
                  260                    265                    270

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser  
                  275                    280                    285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr  
 290 295 300

Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Glu Lys Ile Asp Arg Lys Glu Pro Leu  
 305 310 315 320

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly  
 325 330 335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg  
 340 345 350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly  
 355 360 365

Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp  
 370 375 380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr  
 385 390 395 400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val  
 405 410 415

Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro  
 420 425 430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe  
 435 440 445

Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly  
 450 455 460

Trp Phe Ser Asp Trp Lys Glu Thr Ala Ala Ala Leu Gly Phe Ala Ala  
 465 470 475 480

Ile Ser Val Ile Leu Ile Ile Gly Leu Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu  
 485 490 495

Cys Arg Arg Arg Lys Gln Lys Lys Val Ile Tyr Lys Asp Val Glu Leu  
 500 505 510

Asn Ser Phe Asp Pro Arg Gln Ala Phe His Arg  
 515 520

ES 2 551 892 T3

<210> 27  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 5 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Virus Chandipura  
  
 10 <400> 27

Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile  
 1 5 10 15  
  
 Thr Pro Ser Tyr Ser Ser Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys  
 20 25 30  
  
 Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly  
 35 40 45  
  
 Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser  
 50 55 60  
  
 Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys  
 65 70 75 80  
  
 His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro  
 85 90 95  
  
 Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp  
 100 105 110  
  
 Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Val Ser Pro  
 115 120 125  
  
 Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu  
 130 135 140  
  
 Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr  
 145 150 155 160  
  
 Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln  
 165 170 175

Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp  
 180 185 190

Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val  
 195 200 205

Thr Val Ala Tyr Val Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Ala Ile Val  
 210 215 220

Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg  
 225 230 235 240

Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp  
 245 250 255

Val Ser Leu Asp Val Lys Thr Lys Ile Gln Glu Lys Pro Leu Leu Pro  
 260 265 270

Leu Phe Lys Glu Cys Pro Ala Gly Thr Glu Val Arg Ser Thr Leu Gln  
 275 280 285

Ser Asp Gly Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp  
 290 295 300

Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro  
 305 310 315 320

Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr  
 340 345 350

Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Met Lys  
 355 360 365

Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln  
 370 375 380

Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys  
 385 390 395 400

Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile  
 405 410 415

Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His  
 420 425 430

Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile  
 435 440 445

Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Thr  
 450 455 460

Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Glu Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu  
 465 470 475 480

Ile Leu Val Val Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Arg Cys Phe Pro Val  
 485 490 495

Leu Cys Thr Thr Cys Arg Lys Pro Lys Trp Lys Lys Gly Val Glu Arg  
 500 505 510

Ser Asp Ser Phe Glu Met Arg Ile Phe Lys Pro Asn Asn Met Arg Ala  
 515 520 525

Arg Val  
 530

5 <210> 28  
 <211> 611  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> retrovirus ovino Jaagsiekte  
 <400> 28

Met Pro Lys Arg Arg Ala Gly Phe Arg Lys Gly Trp Tyr Ala Arg Gln  
 1 5 10 15

Arg Asn Ser Leu Thr His Gln Met Gln Arg Met Thr Leu Ser Glu Pro  
 20 25 30

ES 2 551 892 T3

Thr Ser Glu Leu Pro Thr Gln Arg Gln Ile Glu Ala Leu Met Arg Tyr  
35 40 45

Ala Trp Asn Glu Ala His Val Gln Pro Pro Val Thr Pro Thr Asn Ile  
50 55 60

Leu Ile Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Arg Ile Gln Asn Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Ala Thr Phe Trp Ala Tyr Ile Pro Asp Pro Pro Met Leu Gln Ser Leu  
85 90 95

Gly Trp Asp Lys Glu Thr Val Pro Val Tyr Val Asn Asp Thr Ser Leu  
100 105 110

Leu Gly Gly Lys Ser Asp Ile His Ile Ser Pro Gln Gln Ala Asn Ile  
115 120 125

Ser Phe Tyr Gly Leu Thr Thr Gln Tyr Pro Met Cys Phe Ser Tyr Gln  
130 135 140

Ser Gln His Pro His Cys Ile Gln Val Ser Ala Asp Ile Ser Tyr Pro  
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Ser Gly Ile Asp Glu Lys Thr Gly Met Arg Ser Tyr  
165 170 175

Arg Asp Gly Thr Gly Pro Leu Asp Ile Pro Phe Cys Asp Lys His Leu  
180 185 190

Ser Ile Gly Ile Gly Ile Asp Thr Pro Trp Thr Leu Cys Arg Ala Arg  
195 200 205

Ile Ala Ser Val Tyr Asn Ile Asn Asn Ala Asn Thr Thr Leu Leu Trp  
210 215 220

Asp Trp Ala Pro Gly Gly Thr Pro Asp Phe Pro Glu Tyr Arg Gly Gln  
225 230 235 240

His Pro Pro Ile Ser Ser Val Asn Thr Ala Pro Ile Tyr Gln Thr Glu  
245 250 255

Leu Trp Lys Leu Leu Ala Ala Phe Gly His Gly Asn Ser Leu Tyr Leu  
 260 265 270

Gln Pro Asn Ile Ser Gly Ser Lys Tyr Gly Asp Val Gly Val Thr Gly  
 275 280 285

Phe Leu Tyr Pro Arg Ala Cys Val Pro Tyr Pro Phe Met Val Ile Gln  
 290 295 300

Gly His Met Glu Ile Thr Pro Ser Leu Asn Ile Tyr Tyr Leu Asn Cys  
 305 310 315 320

Ser Asn Cys Ile Leu Thr Asn Cys Ile Arg Gly Val Ala Lys Gly Glu  
 325 330 335

Gln Val Ile Ile Val Lys Gln Pro Ala Phe Val Met Leu Pro Val Glu  
 340 345 350

Ile Thr Glu Glu Trp Tyr Asp Glu Thr Ala Leu Glu Leu Leu Gln Arg  
 355 360 365

Ile Asn Thr Ala Leu Ser Arg Pro Lys Arg Gly Leu Ser Leu Ile Ile  
 370 375 380

Leu Gly Ile Val Ser Leu Ile Thr Leu Ile Ala Thr Ala Val Thr Ala  
 385 390 395 400

Ser Val Ser Leu Ala Gln Ser Ile Gln Val Ala His Thr Val Asp Ser  
 405 410 415

Leu Ser Ser Asn Val Thr Lys Val Met Gly Thr Gln Glu Asn Ile Asp  
 420 425 430

Lys Lys Ile Glu Asp Arg Leu Pro Ala Leu Tyr Asp Val Val Arg Val  
 435 440 445

Leu Gly Glu Gln Val Gln Ser Ile Asn Phe Arg Met Lys Ile Gln Cys  
 450 455 460

His Ala Asn Tyr Lys Trp Ile Cys Val Thr Lys Lys Pro Tyr Asn Thr  
 465 470 475 480

Ser Asp Phe Pro Trp Asp Lys Val Lys Lys His Leu Gln Gly Ile Trp  
485 490 495

Phe Asn Thr Thr Val Ser Leu Asp Leu Leu Gln Leu His Asn Glu Ile  
500 505 510

Leu Asp Ile Glu Asn Ser Pro Lys Ala Thr Leu Asn Ile Ala Asp Thr  
515 520 525

Val Asp Asn Phe Leu Gln Asn Leu Phe Ser Asn Phe Pro Ser Leu His  
530 535 540

Ser Leu Trp Arg Ser Ile Ile Ala Met Gly Ala Val Leu Thr Phe Val  
545 550 555 560

Leu Ile Ile Ile Cys Leu Ala Pro Cys Leu Ile Arg Ser Ile Val Lys  
565 570 575

Glu Phe Leu His Met Arg Val Leu Ile His Lys Asn Met Leu Gln His  
580 585 590

Gln His Leu Met Glu Leu Leu Asn Asn Lys Glu Arg Gly Ala Ala Gly  
595 600 605

Asp Asp Pro  
610

**REIVINDICACIONES**

1. Un rhabdovirus oncolítico para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el rhabdovirus oncolítico codifica:

- 5 (a) una proteína G que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 5, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 5;
- (b) una proteína N que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2;
- (c) una proteína M que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4;
- 10 (d) una proteína P que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 3, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 3; o
- (e) una proteína L que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 6, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 6.

15 2. El rhabdovirus oncolítico para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es un cáncer metastásico.

3. El rhabdovirus oncolítico para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento es mediante administración intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intradérmica, intratumoral, subcutánea, para administración intranasal.

20 4. El rhabdovirus oncolítico para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende adicionalmente la administración de una segunda terapia contra el cáncer, siendo preferiblemente la segunda terapia anti-neoplásica quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, o cirugía, o comprendiendo preferiblemente la segunda terapia contra el cáncer un segundo virus oncolítico tal como un virus vaccinia, un herpes virus, un virus del sarampión, un virus de la enfermedad de Newcastle, un adenovirus, un alfavirus, un parvovirus o un rhabdovirus.

5. El rhabdovirus oncolítico para el uso de la reivindicación 4, en donde el segundo rhabdovirus es virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus Arajas, virus Cocal, virus Isfahan, virus Maraba, virus Piry, virus Alagoas de estomatitis vesicular, virus BeAn 157575, virus Boteke, virus Calchaqui, virus de la anguila americana, virus Gray Lodge, virus Jurona, virus Klamath, virus Kwatta, virus La Joya, virus Malpais Spring, virus del murciélago de Mount Elgon, virus Perinet, virus Tupaia, Farmington, virus Bahia Grande, virus Muir Springs, virus Reed Ranch, virus Hart Park, virus Flanders, virus Kamese, virus Mosqueiro, virus Mossuril, virus Barur, virus Fukuoka, virus Kern Canyon, virus Nkolbisson, virus Le Dantec, virus Keuraliba, virus Connecticut, virus New Minto, virus Sawgrass, virus Chaco, virus Sena Madureira, virus Timbo, virus Almpiwar, virus Aruac, virus Bangoran, virus Bimbo, virus Bivens Arm, virus del cangrejo azul, virus Charleville, virus de la planicie costera, virus DakArK 7292, virus Entamoeba, virus Garba, virus Gossas, virus Humpty Doo, virus Joinjakaka, virus Kannamangalam, virus Kolongo, virus Koolpinyah, virus Kotonkon, virus Landjia, virus Manitoba, virus Marco, virus Nasoule, virus Navarro, virus Ngaingan, virus Oak-Vale, virus Obodhiang, virus Oita, virus Ouango, virus Parry Creek, virus de los cíclidos de Rio Grande, virus Sandjimba, virus Sigma, virus Sripur, virus Sweetwater Branch, virus Tibrogargan, virus Xiburema, virus Yata, Rhode Island, virus del Río Adelaide, virus Berrimah, virus Kimberley o virus de la fiebre efímera bovina.

6. Un rhabdovirus oncolítico que codifica:

- 45 (a) una proteína G que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 5, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 5;
- (b) una proteína N que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2;
- (c) una proteína M que tiene al menos un 85 % de identidad de aminoácidos con la SEC ID N° 4, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4;
- 50 (d) una proteína P que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 3, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 3; o
- (e) una proteína L que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 6, o que tiene al menos 40 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 6.

7. El rhabdovirus oncolítico de la reivindicación 6 para su uso en medicina.

55

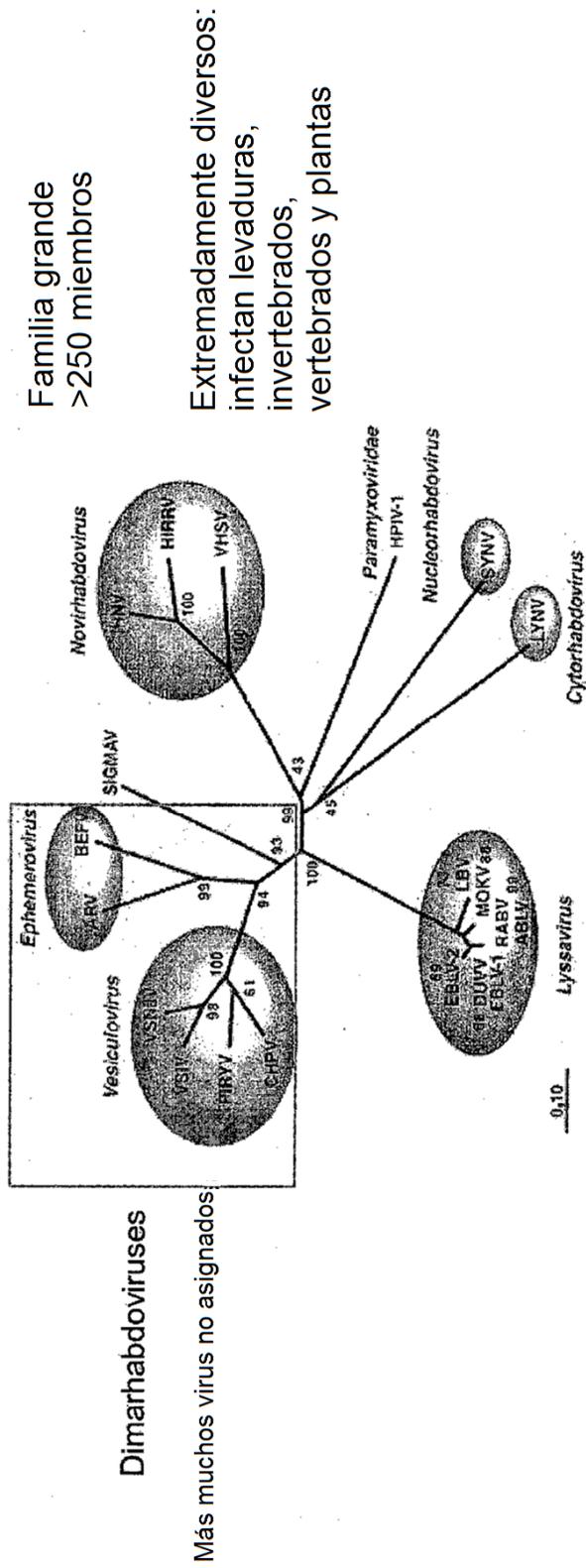


FIG. 1

Citotoxicidad  
Panel NCI60  
96 h

Leyenda  
EC<sub>50</sub>

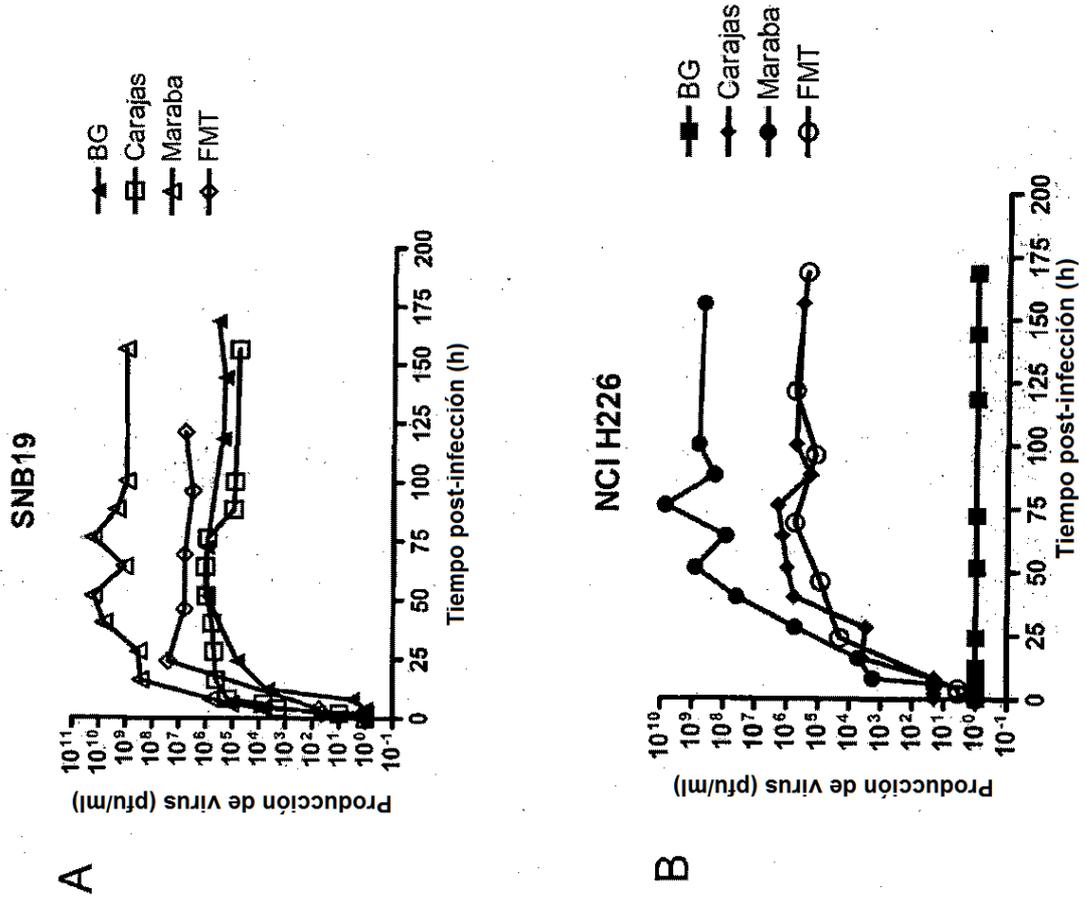
- 1= <0,001
- 2= <0,01
- 3= <0,1
- 4= <1
- 5= <10
- 6= >10
- 7= >>10

Orga- nismo	Fuente	Línea celular	Día	Ms	EC	MEC	DTI	ENT	WPI	WV
Humano	Riesco	JZCS	Día 4	3	3	4	1	1	1	2
Humano	Osteosarcoma	JCF1(7)	Día 4	5	5	5	2	2	2	2
Humano	Mama	JDA-MB-23	Día 4	4	4	4	2	1	1	1
Humano	Mama	JDA-MB-43	Día 4	5	5	5	2	2	2	2
Humano	Mama	NCIADR-RE	Día 4	5	5	5	3	2	4	2
Humano	Mama	147D	Día 4	4	4	4	2	2	2	2
Humano	SNC	SF298	Día 4	4	4	4	1	2	1	2
Humano	SNC	SF295	Día 4	5	4	5	3	2	2	3
Humano	SNC	SF309	Día 4	5	5	5	1	1	1	1
Humano	SNC	SNB19	Día 4	2	1	4	1	1	1	3
Humano	SNC	SNB75	Día 4	5	5	5	1	2	5	1
Humano	SNC	U118	Día 4	5	5	5	4	1	2	1
Humano	SNC	UJ43	Día 4	3	4	4	1	1	1	2
Humano	SNC	U373	Día 4	2	1	3	1	1	1	2
Humano	Colon	COLD 205	Día 4	4	4	4	3	5	3	3
Humano	Colon	HCT118	Día 4	5	5	5	1	2	1	2
Humano	Colon	HCT15	Día 4	4	4	4	2	3	3	3
Humano	Colon	HT29	Día 4	4	4	4	2	1	2	3
Humano	Colon	SW620	Día 4	3	3	3	2	2	1	4
Humano	Colon	SW620	Día 4	5	5	5	3	3	3	1
Humano	Metastoma	M14	Día 4	5	5	5	4	5	2	3
Humano	Metastoma	MALME-3M	Día 4	5	5	5	4	5	2	3
Humano	Metastoma	SKNSH-2b	Día 4	4	4	4	5	1	3	1
Humano	Metastoma	JACC627	Día 4	4	4	4	2	2	1	2
Humano	Metastoma	JACC627	Día 4	5	5	5	2	3	4	2
Humano	Pulmon	A549	Día 4	5	5	5	1	2	3	1
Humano	Pulmon	HOP92	Día 4	5	5	5	1	2	3	2
Humano	Pulmon	HOP92	Día 4	5	5	5	1	2	3	2
Humano	Pulmon	HOP92	Día 4	5	5	5	1	2	3	2
Humano	Pulmon	HOP92	Día 4	5	5	5	1	2	3	2
Humano	Pulmon	NCH-H22B	Día 4	5	5	5	3	2	4	3
Humano	Pulmon	NCH-H23	Día 4	5	5	5	3	2	1	2
Humano	Ovario	OVCAR3	Día 4	5	5	5	3	3	2	2
Humano	Ovario	OVCAR3	Día 4	5	5	5	3	3	2	2
Humano	Ovario	OVCAR4	Día 4	4	4	4	2	2	3	1
Humano	Ovario	OVCAR6	Día 4	2	1	5	4	1	1	1
Humano	Pancreas	PANC-1	Día 4	2	1	5	4	1	1	1
Humano	Prostata	DUH45	Día 4	4	4	4	3	2	5	3
Humano	Prostata	PC3	Día 4	4	4	4	3	2	5	3
Humano	Renal	786-O	Día 4	5	4	5	4	1	5	1
Humano	Renal	ACHN	Día 4	5	4	5	1	2	1	3
Humano	Renal	5M12C	Día 4	5	5	5	2	3	4	2
Humano	Renal	5M12C	Día 4	5	5	5	1	2	4	2
Humano	Renal	TK10	Día 4	4	4	4	3	2	5	3
Humano	Renal	4431	Día 4	5	5	5	4	3	5	4
Humano	Renal	4431	Día 4	5	5	5	4	3	5	4
Mono	Ratón, normal	DY-1	Día 4	4	4	4	4	1	1	1
Mono	Ratón, normal	VERO	Día 4	4	4	4	4	1	1	1
Ratón	Mama	EMTB	Día 4	5	5	5	4	3	1	1
Ratón	Mama	4T1	Día 4	3	4	4	1	4	2	3
Ratón	Colon	2T28	Día 4	4	4	4	3	1	1	1
Ratón	Glioma	GL201	Día 4	4	4	4	5	2	2	2

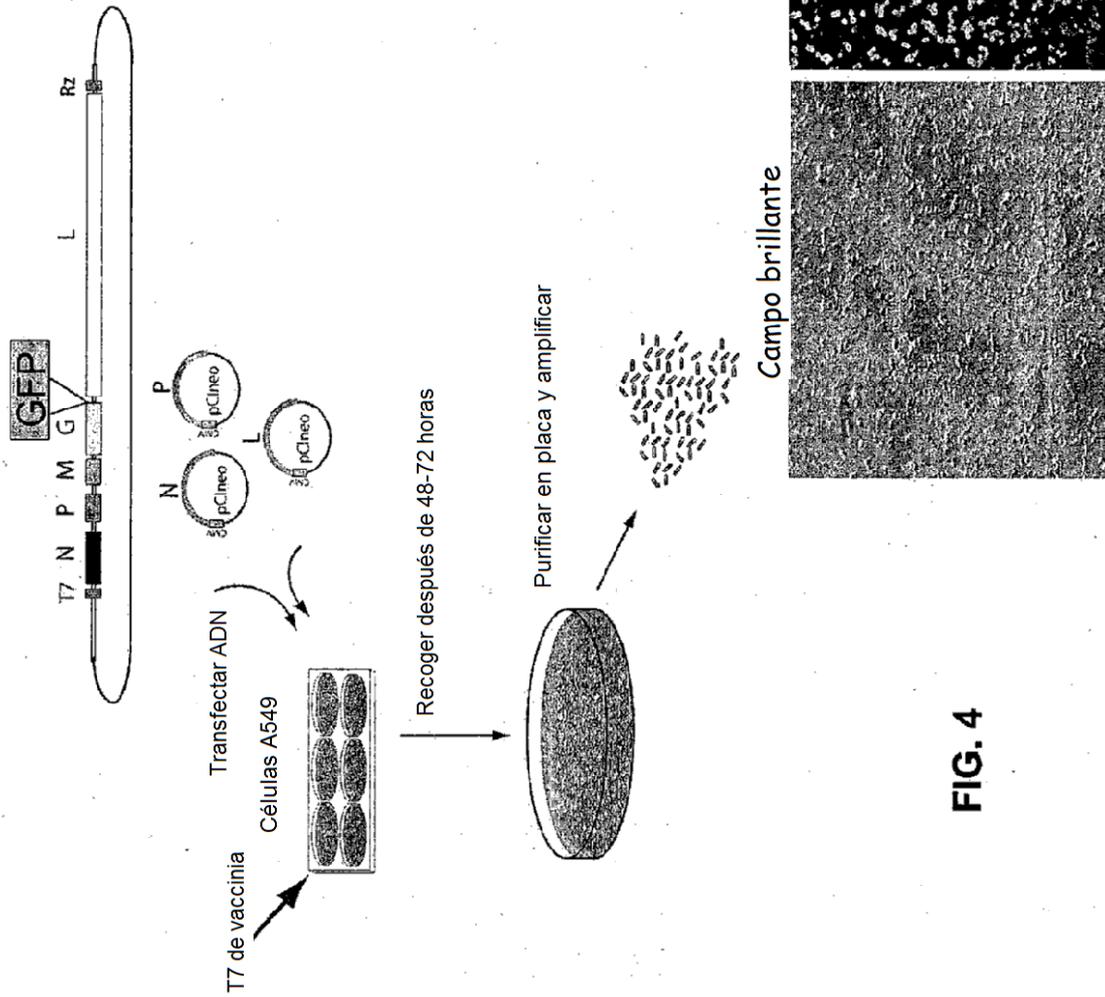
Cepas estrechamente  
relacionadas  
se comportan  
de forma muy diferente  
sobre las mismas células

El mismo virus se comporta  
de forma diferente  
sobre diferentes células

FIG. 2



**FIGS. 3A-3B**



**FIG. 4**

# Evolución dirigida de Bahía Grande

Objetivo: seleccionar variantes con replicación más rápida en GBM humana

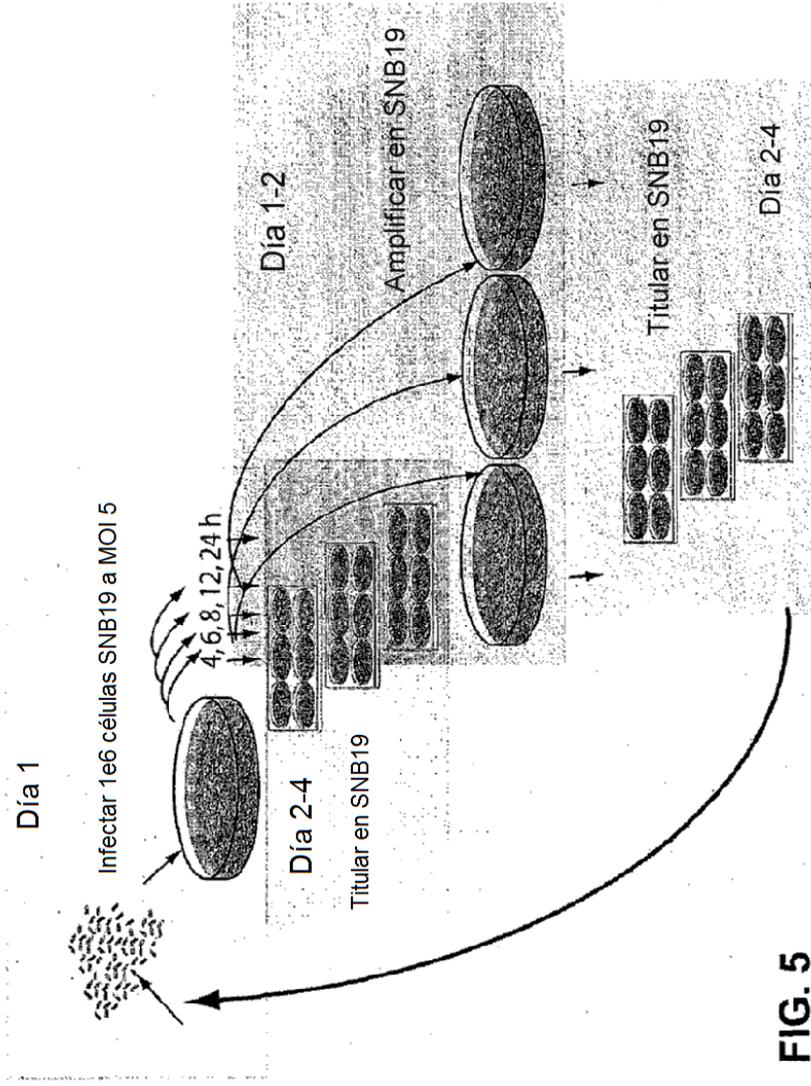


FIG. 5

# Evolución dirigida

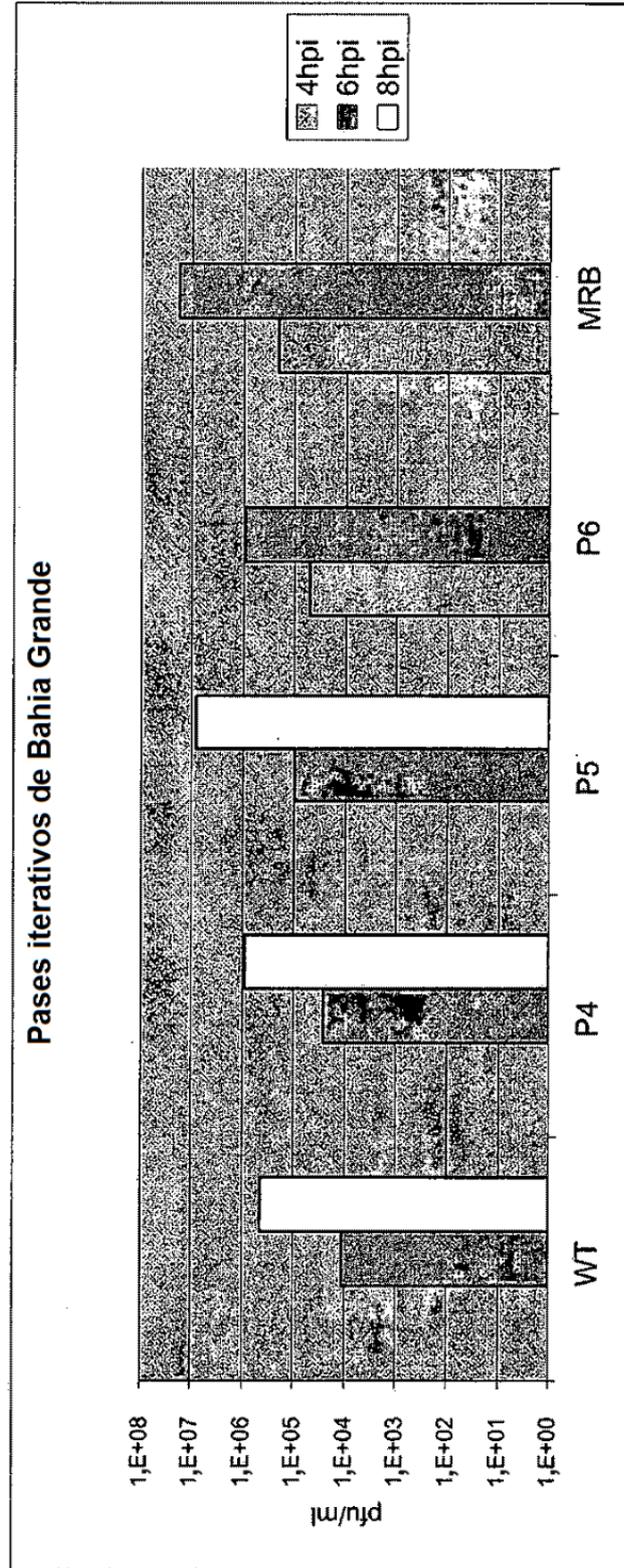


FIG. 6

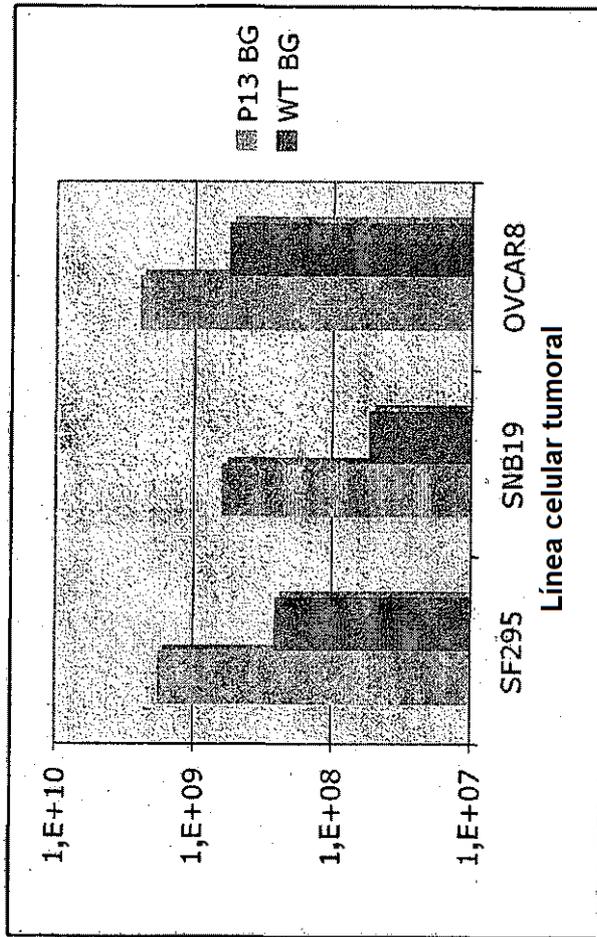


FIG. 7

Bahia Grande y Muir Springs  
no muestran toxicidad

Toxicidad intracraneal

I.C (LD, pfu)

WT VSV	<10
VSV delta M51	<10
Bahia Grande	>1e <sup>7</sup>
Muir Springs	>1e <sup>7</sup>
Bahia Grande P6	>1e <sup>7</sup>

FIG. 8

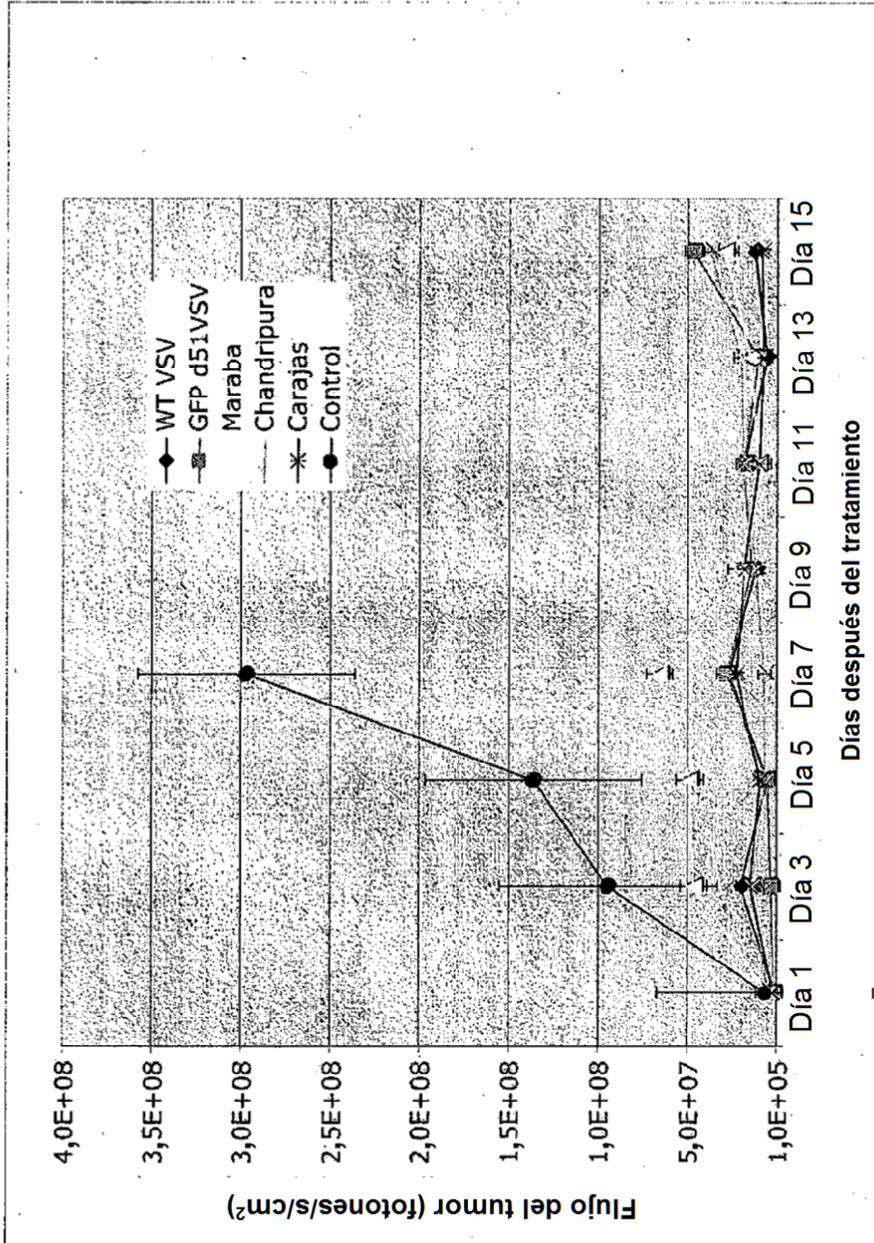


FIG. 9

# Infectividad de VSV WT sin G pseudotipado con diversas G

## 24h MOI 1

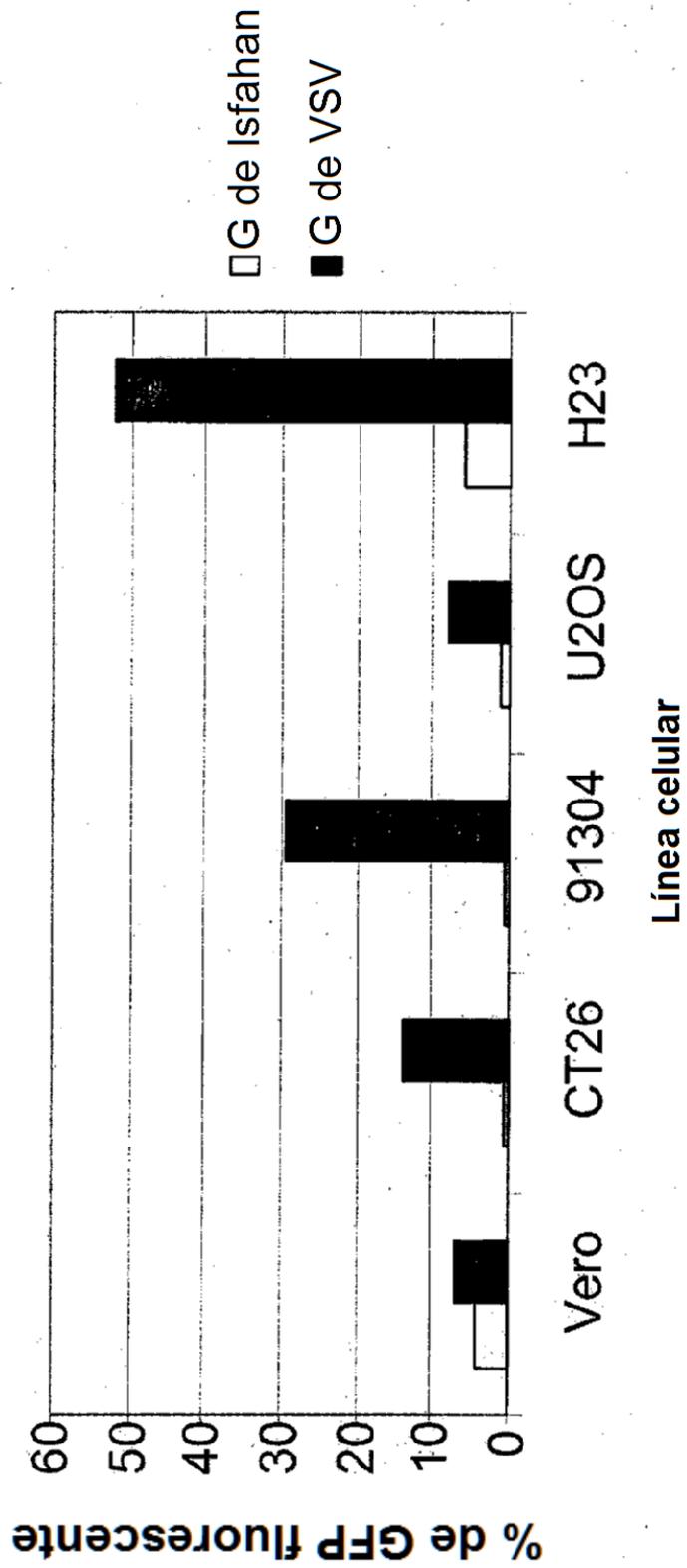


FIG. 10

Curva de crecimiento de una etapa con VSV WT, isfahan y RVR IsfG1

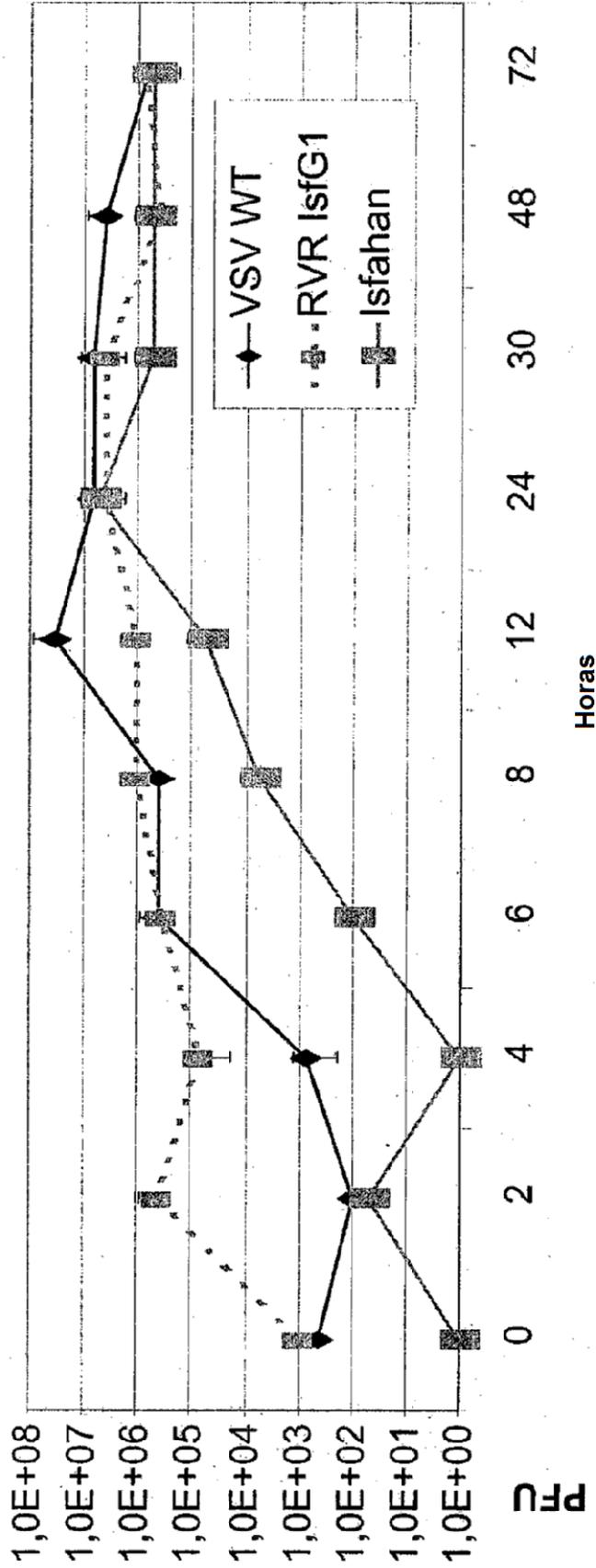
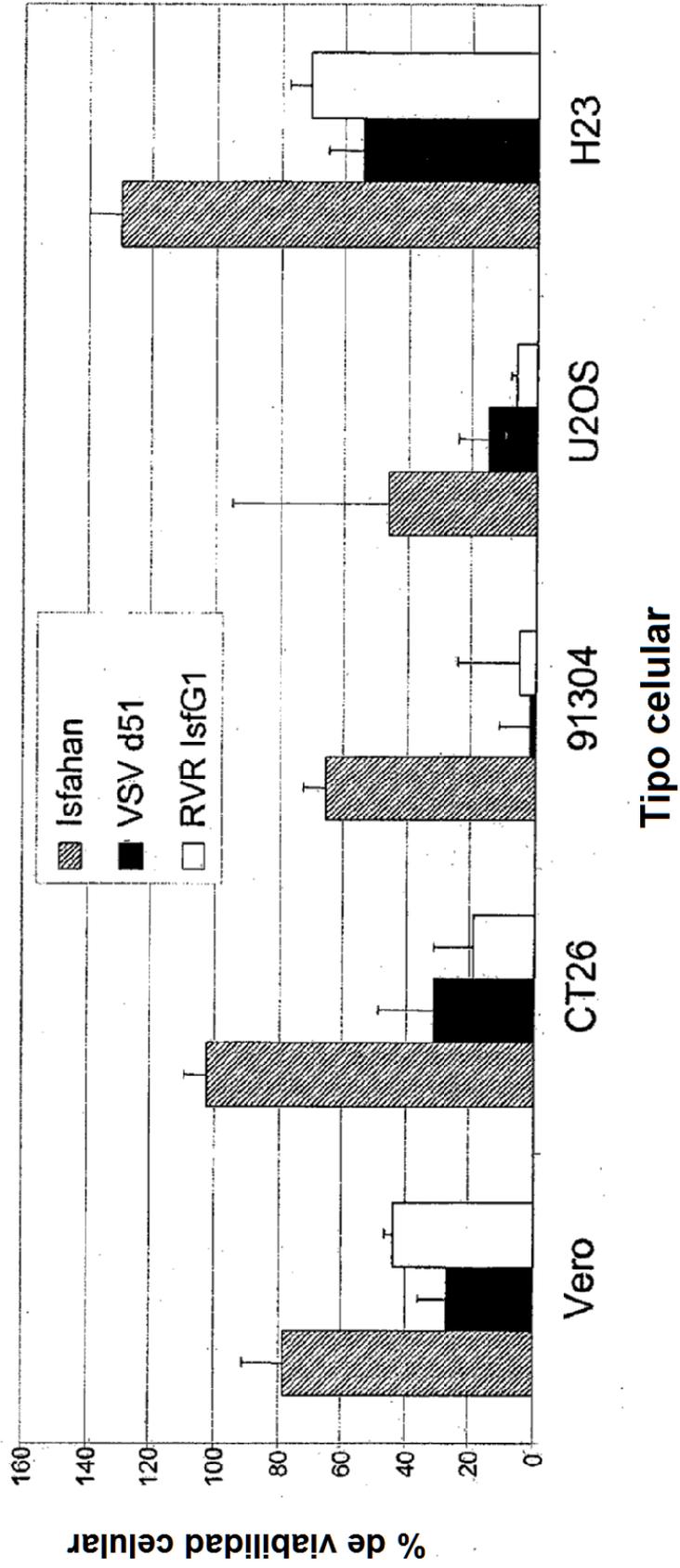
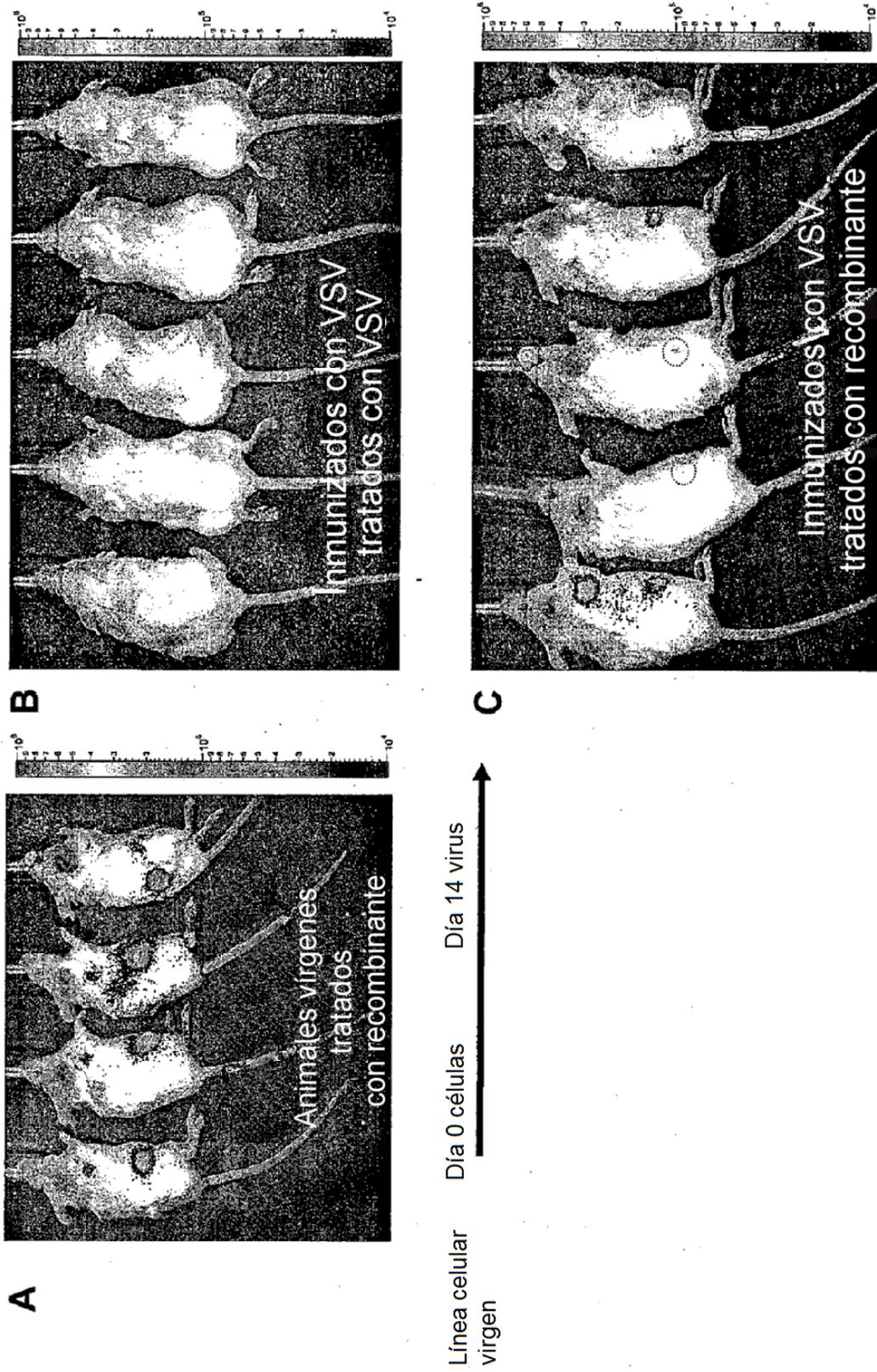


FIG. 11

**Ensayo de MTS  
48 h MOI 0,01**



**FIG. 12**



**FIGs. 13A-13C**

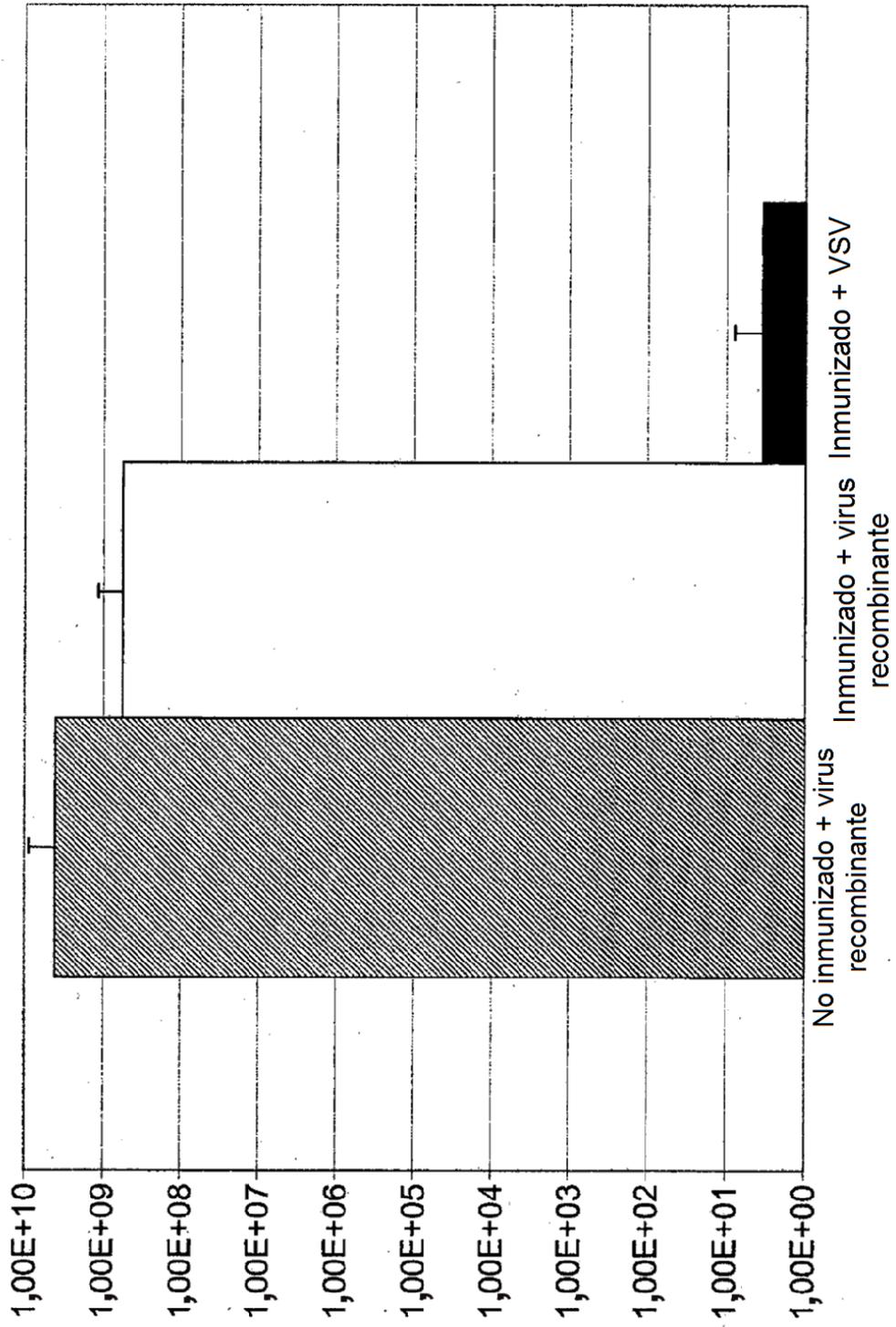


FIG. 14

Curva de crecimiento de una etapa con VSV WT, Chandipura y RVR Cha G1

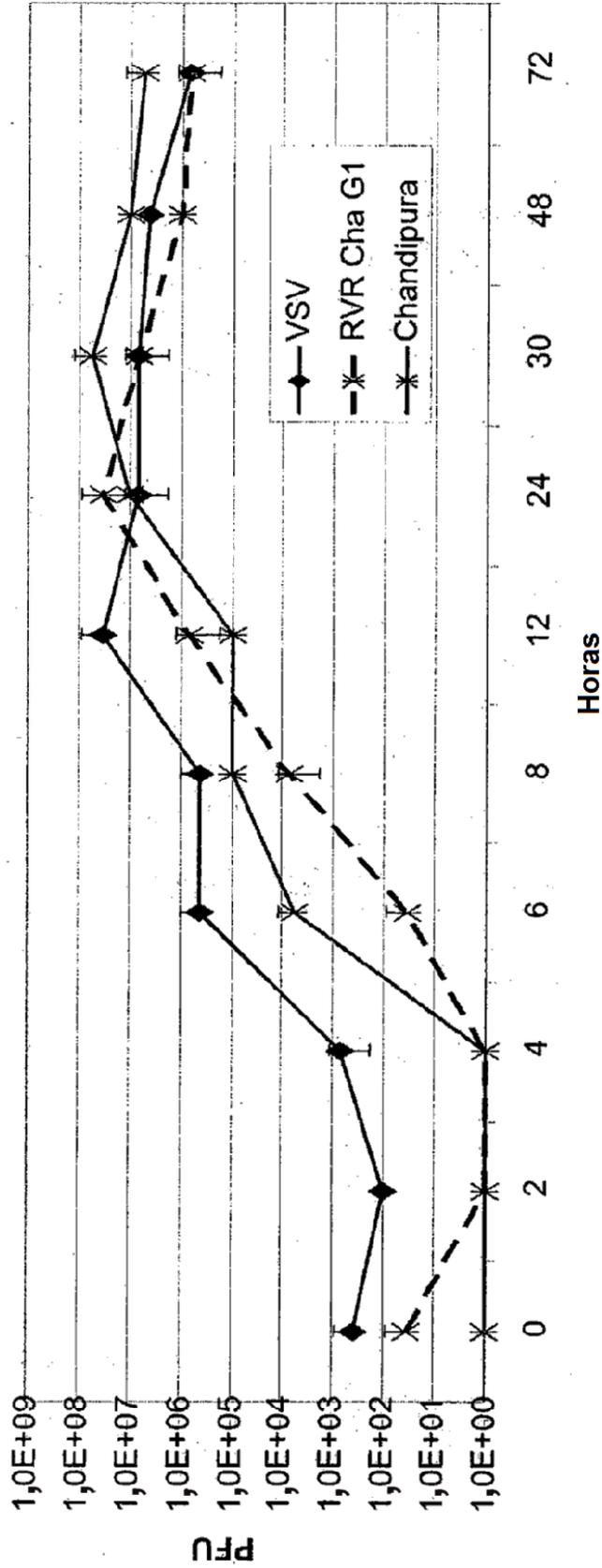


FIG. 15

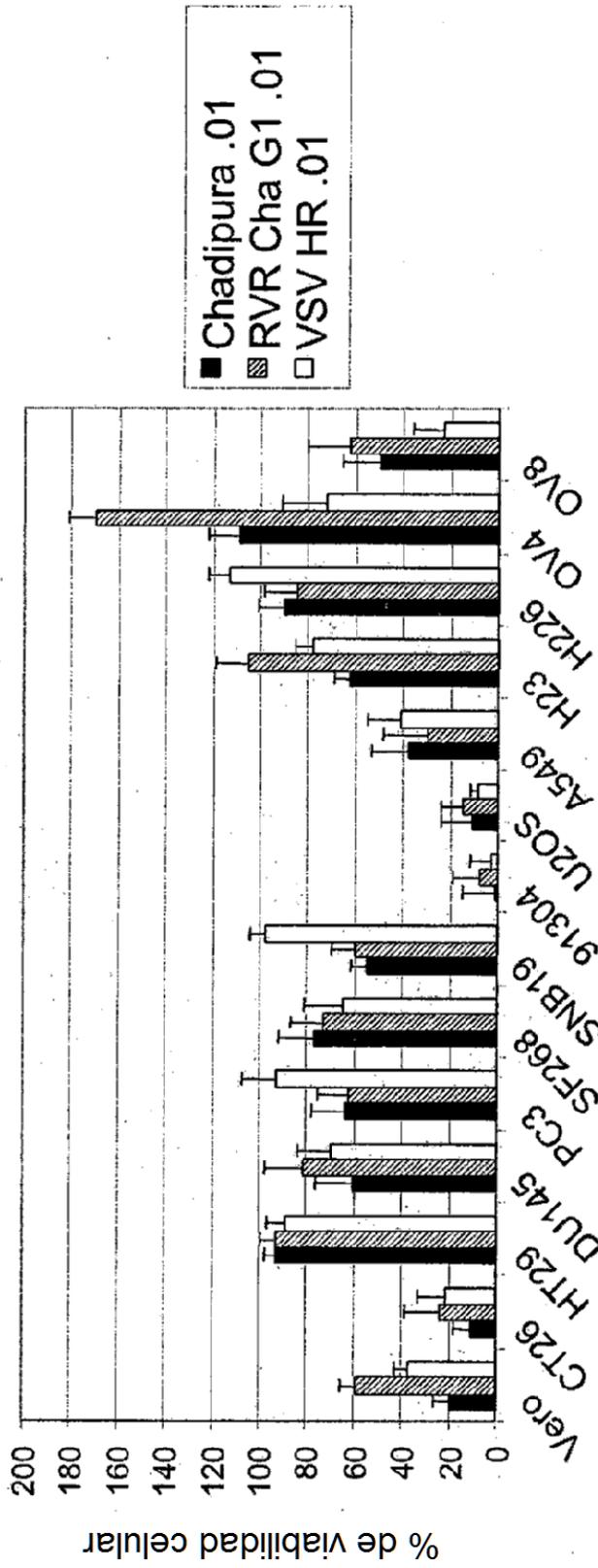


FIG. 16

Curva de crecimiento de una etapa con VSV WT, Maraba y RVR Mar G1

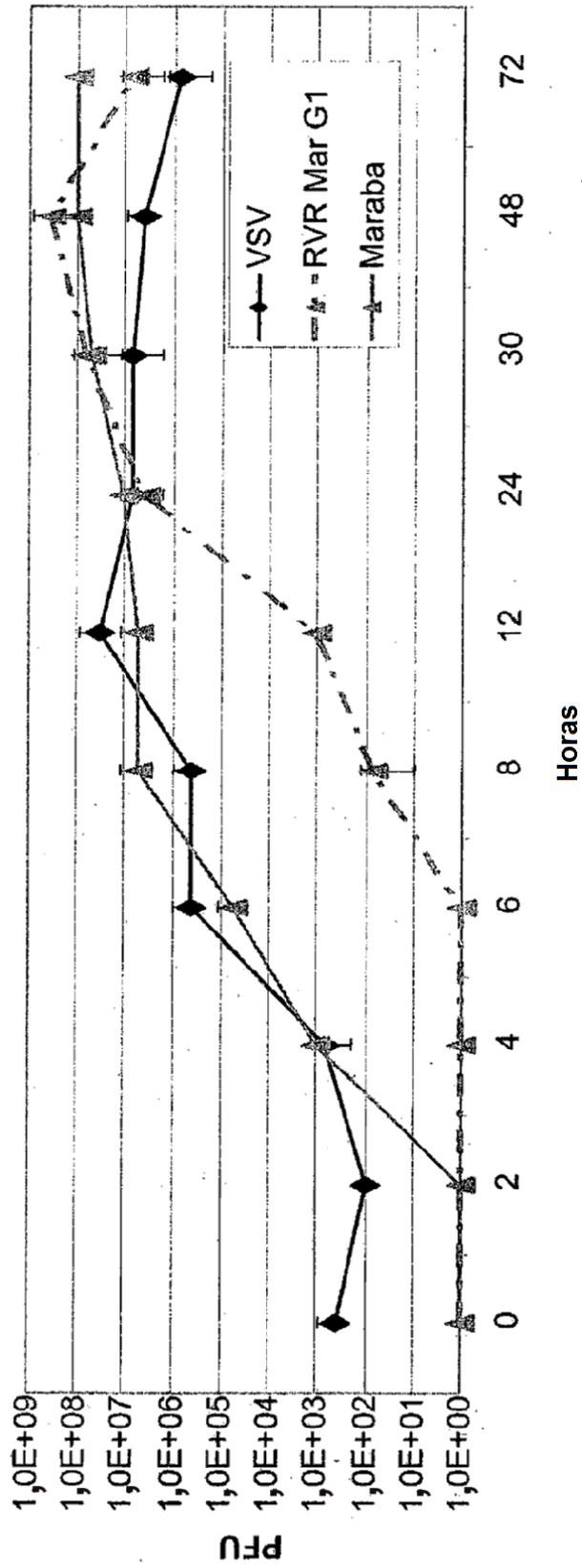


FIG. 17

RVR Mar G1

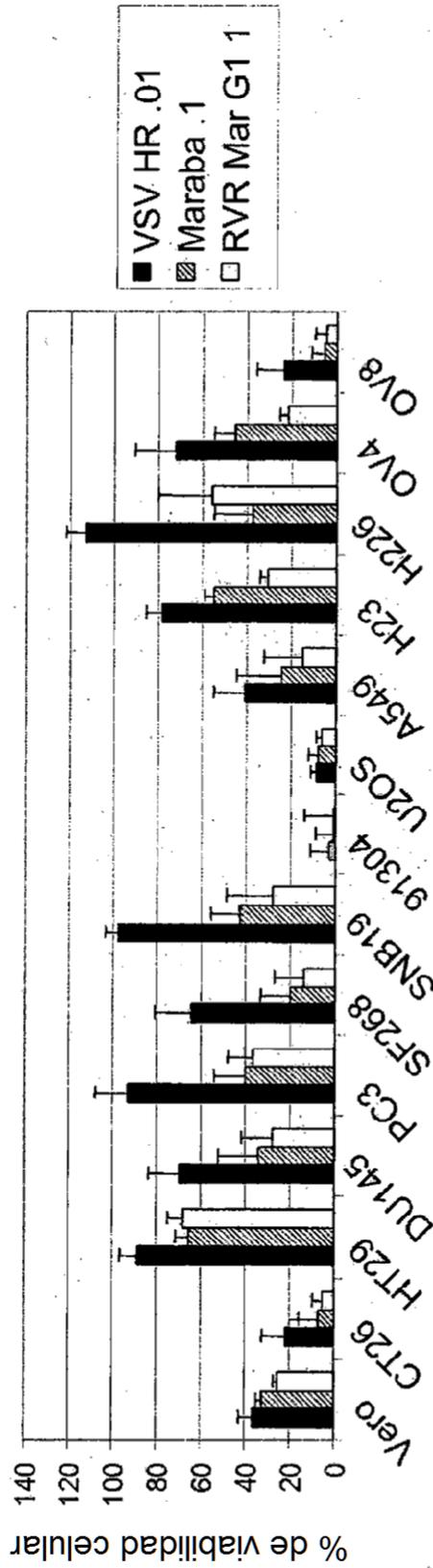


FIG. 18