

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 529**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/145 (2006.01)
C12N 15/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2012** **PCT/CA2012/050385**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012** **WO12167382**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2012** **E 12796050 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017** **EP 2718427**

54 Título: **Composiciones para tratamiento de glioblastoma**

30 Prioridad:

08.06.2011 US 201161494628 P

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

28.07.2017

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL OF EASTERN ONTARIO
RESEARCH INSTITUTE INC. (100.0%)
401 Smyth Road
Ottawa, Ontario K1H 8L1, CA**

72 Inventor/es:

STOJDL, DAVID F.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 627 529 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

Composiciones para tratamiento de glioblastoma

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a rhabdovirus y a su uso como un tratamiento oncolítico. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a rhabdovirus de Farmington y a su uso en el tratamiento de glioblastoma.

10 **Antecedentes**

Esta sección proporciona información de fondo relacionada con la presente divulgación que no es necesariamente técnica anterior.

15 El cáncer de cerebro es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en pacientes menores de 35 años y representa aproximadamente el 10 % de todos los cánceres diagnosticados en Norteamérica. El tratamiento de tumores cerebrales se complica por el hecho de que hay más de 120 tipos diferentes, que varían de astrocitomas de grado bajo a glioblastomas de grado alto (GBM). Los gliomas malignos, tales como GBM, son con mucho el cáncer cerebral más común hallado en adultos y uno de los más difíciles de tratar. Incluso con opciones de tratamiento
20 individuales y multimodales agresivas tales como cirugía, quimioterapia, radiación e inhibidores de moléculas pequeñas, la supervivencia ha permanecido sin cambios durante las últimas tres décadas con una mediana de la supervivencia de menos de un año después del diagnóstico. Las razones para el fracaso de los tratamientos convencionales es multifactorial incluyendo la naturaleza altamente infiltrante/invasiva de GBM, la limitación de suministro de fármaco a través de la barrera hematoencefálica y el parénquima neural, y la heterogeneidad genética
25 resultante en resistencia intrínseca a tratamientos disponibles y el aumento de clones resistentes agresivos. Por lo tanto, hay una extrema necesidad de nuevas opciones de tratamiento que han conducido al renacimiento de la terapia vírica oncolítica para GBM.

En la actualidad, la eficacia y seguridad de varios virus oncolíticos con diversas estrategias de dirección tumoral se
30 están evaluando en el laboratorio y la clínica contra GBM. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) de rhabdovirus constituye uno de estos virus eficaces que se están ensayando preclínicamente. Sin embargo, una vía deseada de administración vírica para GBM es el suministro intracerebral, que no es en la actualidad posible con VSV debido a su neurotoxicidad. Los intentos previos en la técnica de tratamiento de tumores cerebrales tales como glioblastoma se desvelan por ejemplo en Journal of neuroscience, 2008, vol. 28,1882-1893. En este artículo, se llevaron a cabo
35 experimentos usando una cepa particular de virus de la estomatitis vesicular.

Sumario

La invención a la que se refiere la presente memoria descriptiva se expone en las reivindicaciones 1-15. Es un
40 objeto de la presente divulgación evitar o mitigar al menos una desventaja de virus oncolíticos previos. Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación puede mostrar niveles reducidos de neurotoxicidad.

La presente tecnología incluye sistemas, métodos, procesos, artículos y composiciones relacionados con rhabdovirus, tales como rhabdovirus de Farmington, y secuencias nucleotídicas y proteicas relacionadas del mismo,
45 y el uso de estos en tratamientos oncolíticos, por ejemplo tratamientos para glioblastoma.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una partícula vírica aislada capaz de producir un polinucleótido de ADNc que incluye una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 cuando el virus está en una
50 célula hospedadora.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una partícula vírica aislada que incluye un polinucleótido de ARN que incluye una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona una partícula vírica aislada que tiene un genoma que incluye fases abiertas de lectura que codifican: una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3, o una variante de la misma; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 4, o una variante de la misma; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 5, o una variante de la misma; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 6, o una variante de la misma; y una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma.
60

La variante de una proteína de referencia puede ser una proteína que tiene una secuencia que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de la proteína de referencia, y en la que la proteína variante mantiene la misma función biológica que la proteína de referencia.

65 En algunos ejemplos, al menos una de las fases abiertas de lectura codifica una proteína que tiene una secuencia que es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 y 7. En dichos ejemplos, la

variante de una proteína de referencia puede ser una proteína que tenga una secuencia que es al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de la proteína de referencia, y en la que la proteína variante mantiene la misma función biológica que la proteína de referencia.

El genoma vírico puede incluir fases abiertas de lectura que codifican: una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 4; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 5; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 6; y una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7.

La partícula vírica aislada puede incluir además al menos una fase abierta de lectura adicional para codificar al menos una proteína adicional. La proteína adicional puede ser una proteína inmunogénica.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una partícula vírica aislada capaz de producir un polinucleótido de ADNc cuando el virus está en una célula hospedadora, teniendo el polinucleótido de ADNc una secuencia que incluye: SEQ ID NO: 8, o una variante conservativa de la misma; SEQ ID NO: 9 o una variante conservativa de la misma; SEQ ID NO: 10 o una variante conservativa de la misma; SEQ ID NO: 11 o una variante conservativa de la misma; SEQ ID NO: 12 o una variante conservativa de la misma; y promotores de las mismas.

La variante conservativa de una secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de referencia de nucleótidos. La variante conservativa puede ser una secuencia que comprenda una o más sustituciones silenciosas.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, puede usarse una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede ser un cáncer cerebral. El cáncer cerebral puede ser un glioblastoma. La partícula vírica aislada puede usarse para infectar una célula en la que la célula infectada es para el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación puede usarse para inducir una respuesta inmunogénica en una persona a la que se administra el virus. La respuesta inmunogénica puede ser una respuesta antineoplásica. La partícula vírica aislada puede usarse para infectar una célula en la que la célula infectada se usa para generar la respuesta inmunogénica.

La partícula vírica aislada puede formularse para suministro directo al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La partícula vírica aislada puede formularse para administración mediante inyección intratecal, intravenosa o intracraneal.

La célula infectada puede formularse para suministro directo al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La célula infectada puede formularse para administración mediante inyección intratecal, intravenosa o intracraneal.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación a un paciente que tenga cáncer. El cáncer puede ser un cáncer cerebral. El cáncer cerebral puede ser un glioblastoma.

La partícula vírica aislada puede administrarse al paciente directamente. Por ejemplo, la partícula vírica aislada puede administrarse directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica, o cualquier combinación de las mismas. La partícula vírica aislada puede administrarse al paciente por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.

Como alternativa, una célula puede infectarse con la partícula vírica aislada y la célula infectada puede administrarse al paciente. La célula infectada puede administrarse directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La célula infectada puede administrarse al paciente por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para inducir una respuesta inmunogénica en un paciente, incluyendo el método administrar una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación al paciente.

La partícula vírica aislada puede administrarse al paciente directamente. Por ejemplo, la partícula vírica aislada puede administrarse directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La partícula vírica aislada puede administrarse al paciente por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.

Como alternativa, una célula puede infectarse con la partícula vírica aislada y la célula infectada puede administrarse al paciente. La célula infectada puede administrarse directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La célula infectada puede administrarse al paciente por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente divulgación, se proporciona un kit para el tratamiento del cáncer en un paciente, incluyendo el kit: una partícula vírica aislada de la presente divulgación e instrucciones para administración de la partícula vírica aislada al paciente.

El cáncer puede ser un cáncer cerebral. El cáncer cerebral puede ser un glioblastoma.

La partícula vírica aislada puede formularse para suministro directo al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La partícula vírica aislada puede formularse para administración mediante inyección intratecal, intravenosa o intracraneal.

Como alternativa, la partícula vírica aislada puede formularse para infección de una célula en la que la célula es para suministro al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. La célula puede ser para administración mediante inyección intratecal, intravenosa o intracraneal.

Otros aspectos y características de la presente divulgación resultarán evidentes para los expertos habituales en la materia tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas junto con las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora realizaciones de la presente divulgación, solamente como ejemplo, en referencia a las figuras adjuntas.

Figura 1. Introducción al Virus FMT: A) Región aislada; B) El Alineamiento de Aminoácidos por Blast de 5 posibles fases abiertas de lectura (ORF) de FMT (N, P, G, M y L) revela poca homología de secuencia con secuencias conocidas en la base de datos de NCBI; C) gel de SDS PAGE de virus FMT que muestra 4 de las 5 proteínas de ORF de FMT predichas; D) Árbol filogenético de diversos rhabdovirus; E) Ejemplo de una cepa de FMT que expresa GFP completamente replicativa; y F) Microfotografía electrónica de virión de FMT (adaptado de Tesh *et al.*, Emerging Infect Dis. 2002).

Figura 2. Perfil de seguridad de FMT: A) Exploración de neurotoxicidad intracraneal para rhabdovirus; B) Evaluación de la función motora por tiempo en rotorod después de inyección intracerebral de FMT en ratones Balb/C; C) determinación de DTM de FMT en ratones Balb/C a los que se ha inyectado IV dosis crecientes (3x10⁶ ufp-3x10⁹ ufp) de virus FMT; D) Detección de virus FMT viables 3 meses después de la inoculación; E) Histopatología del cerebro después de inoculación intracelular con FMT, VSV o PBS.

Figura 3. FMT destruye fuerte y selectivamente células tumorales cerebrales: A) Sumario de citotoxicidad de virus FMT *in vitro*; B) FMT es un destructor fuerte y selectivo de líneas celulares de GBM; C) Evaluación de la fuerza de FMT contra células tumorales y normales.

Figura 4. Eficacia *In Vivo* de FMT en modelos preclínicos de GBM: A) Modelo de Xenoinjerto de Glioma Humano U-87 MG; B) Representación de supervivencia de Kaplan Meier de animales tratados con una única dosis IC (1x10⁵ ufp) o IV (5x10⁸ ufp); C) Microfotografía de fluorescencia de cerebro de ratón infectado con simulación (con tumor U87MG marcado con GFP) frente a cerebro de ratón tratado con FMT; D) Modelo de GBM de ratón Singénico Tardío usando la línea celular CT2A tratada tanto IC como IV con FMT o PBS.

Figura 5. El virus FMT induce inmunidad antitumoral: A) ratones C57/B6 implantados con células de glioma murino CT2A en el cuerpo estriado y tratados con FMT y curados del tumor inicial y después expuestos a células CT2A implantadas en el cuerpo estriado frente a ratones sin tratamiento previo con células CT2A implantadas como control; B) ratones C57/B6 con implantación de células de glioma murino CT2A en el cuerpo estriado y que se permite que desarrollen tumores recibieron inyecciones de suero policlonal anti CD8 para retirar linfocitos T CD8+ o suero preinmunitario coincidente como control, y después ambos grupos se trataron con una única dosis intracraneal de FMT para inducir regresiones tumorales.

Figura 6. El virus FMT bloquea la producción de IFN e infecta de forma productiva células tumorales y normales: A) transferencia de Western de células tumorales cerebrales humanas (SNB19) y astrocitos humanos normales primarios (NHA) que muestran infección por virus FMT y producción de proteínas; B) Curva de crecimiento de producción de virus FMT en células SNB19 y NHA; C) Microscopía de fluorescencia de virus rec-FMT o Maraba-Δ51 que expresa GFP añadido a una monocapa de células GM38 con y sin tratamiento con la proteína B18R inhibidora de interferón de tipo I derivada de virus vaccinia (W-B18R); D) Tamaño de placas y focos de infección medido a partir de microscopía de fluorescencia; E) Bioensayo de interferón en células PC3.

Figura 7. Mecanismo Nuevo de Dirección Tumoral: A) Título vírico determinado en Teratocarcinoma y células NT2 diferenciadas infectadas con los virus indicados; B) Teratocarcinoma y células NT2 diferenciadas infectadas con los virus indicados y ensayadas con respecto a viabilidad usando colorante metabólico de Alamar blue; C) transferencia de Western de varios componentes de la cascada de señalización apoptótica celular después de infección de células tumorales (SNB19) o normales (NHA); D. Esquema de la cascada de señalización de apoptosis celular.

Descripción

Definiciones

A lo largo de la presente divulgación, se emplean varios términos que se definen en los siguientes párrafos.

Como se usa en el presente documento, las palabras “desear” o “deseable” se refieren a realizaciones de la tecnología que proporcionan ciertos beneficios, en ciertas circunstancias. Sin embargo, también pueden ser deseables otras realizaciones, en las mismas circunstancias o en otras. Además, la enumeración de una o más realizaciones deseadas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no se pretende que excluya otras realizaciones del alcance de la tecnología.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la palabra “incluir”, y sus variantes, no sea limitante, de modo que la enumeración de artículos en una lista no excluya otros artículos similares que también pueden ser útiles en los materiales, las composiciones, los dispositivos y los métodos de la presente tecnología. De forma similar, no se pretende que los términos “puede” y “podría” sean limitantes, de modo que la indicación de que una realización puede o podría comprender ciertos elementos o características no excluye otras realizaciones de la presente tecnología que no contienen esos elementos o características.

Aunque la expresión abierta “que comprende”, como un sinónimo de términos no restrictivos tales como que incluye, que contiene o que tiene, se usa en el presente documento para describir y reivindicar realizaciones de la presente tecnología, las realizaciones pueden describirse de forma alternativa usando expresiones más limitantes tales como “que consiste en” o “que consiste esencialmente en”. Por lo tanto, para cualquier realización dada que enumere materiales, componentes o etapas del proceso, la presente tecnología también incluye específicamente realizaciones que consisten en, o consisten esencialmente en, dichos materiales, componentes o procesos excluyendo materiales, componentes o procesos adicionales (para que consiste en) y excluyendo materiales, componentes o procesos adicionales que afecten a las propiedades significativas de la realización (para que consiste esencialmente en), incluso aunque dichos materiales, componentes o procesos adicionales no se enumeren explícitamente en la presente solicitud. Por ejemplo, la enumeración de una composición o un proceso enumerando los elementos A, B y C prevé específicamente realizaciones que consisten en, y consisten esencialmente en A, B y C, excluyendo un elemento D que pueda enumerarse en la técnica, incluso aunque el elemento D no se describa de forma explícita como excluido en el presente documento.

Como se indica en el presente documento, todos los porcentajes de composición son en peso de la composición total, a no ser que se especifique de otro modo. Las divulgaciones de intervalos son, a no ser que se especifique de otro modo, inclusivas de puntos finales e incluyen todos los valores distintos e intervalos divididos adicionalmente dentro del intervalo completo. Por lo tanto, por ejemplo, un intervalo “de A a B” o “de aproximadamente A a aproximadamente B” incluye A y B. La divulgación de valores e intervalos de valores para parámetros específicos (tales como temperaturas, pesos moleculares, porcentajes de peso, etc.) no excluyen otros valores e intervalos de valores útiles en el presente documento. Se prevé que dos o más valores ejemplificados específicos para un parámetro dado pueden definir puntos finales para un intervalo de valores que pueden reivindicarse para el parámetro. Por ejemplo, si se ejemplifica que el parámetro X en el presente documento tiene el valor A y también se ejemplifica que tiene el valor Z, se prevé que el parámetro X puede tener un intervalo de valores de aproximadamente A a aproximadamente Z. De forma similar, se prevé que la divulgación de dos o más intervalos de valores para un parámetro (sean dichos intervalos anidados, solapantes o distintos) subsume todas las posibles combinaciones de intervalos para el valor que podrían reivindicarse usando puntos finales de los intervalos desvelados. Por ejemplo, si se ejemplifica en el presente documento que el parámetro X tiene valores en el intervalo de 1-10, o 2-9, o 3-8, también se prevé que el parámetro X pueda tener otros intervalos de valores incluyendo 1-9, 1-8, 1-3, 1-2, 2-10, 2-8, 2-3, 3-10 y 3-9.

“Un” como se usa en el presente documento indica que “al menos uno” del artículo está presente; una pluralidad de dichos artículos pueden estar presentes, cuando sea posible.

“Aproximadamente” cuando se aplica a valores indica que el cálculo o la medida permite alguna imprecisión ligera en el valor (con algún enfoque para exactitud en el valor; aproximadamente o razonablemente cercano al valor; casi). Si, por alguna razón, la imprecisión proporcionada por “aproximadamente” no se entiende de otro modo en la técnica con este significado ordinario, entonces “aproximadamente” como se usa en el presente documento indica al menos variaciones que pueden surgir de métodos ordinarios de medición o uso de dichos parámetros.

Como se usa en el presente documento, la expresión “y/o” incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los articulados enumerados asociados.

5 Como se usa en el presente documento, se entendería que un virus que tiene “niveles reducidos de neurotoxicidad” o “neurotoxicidad reducida” se refiere a un virus que, cuando se inyecta en el cuerpo estriado derecho de un cerebro de ratón a una dosis dada, da como resultado un ratón con menos signos de neurotoxicidad (por ejemplo, pérdida de peso, piloerección, parálisis de las patas posteriores, morbilidad y mortalidad) que un ratón al que se inyecta virus maraba de tipo silvestre.

10 Como se usa en el presente documento, se entendería que “sustancialmente sin nivel de neurotoxicidad” o “sustancialmente sin neurotoxicidad” se refieren a un virus que, cuando se inyecta por vía intracerebral a un ratón a 1e6 ufp, da como resultado un ratón sin signos detectables de función motora reducida como se mide por el tiempo en un rotorod en comparación con el ratón antes de la inyección con el virus.

15 Descripción detallada de ciertas realizaciones

De los más de 250 rhabdovirus identificados en la actualidad, se ha determinado que varios rhabdovirus de tipo silvestre aislados son eficaces en la destrucción de líneas celulares tumorales del SNC manteniendo al mismo tiempo la atenuación en astrocitos humanos normales y neuronas postmitóticas. También se ha determinado que 20 varios de estos aislados víricos fuertes demuestran atenuación notable, dando como resultado 100 % de supervivencia después de la inoculación intracerebral. Esto está en fuerte contraste con los virus Maraba y VSV previamente ensayados.

25 En general, la presente divulgación proporciona un virus oncolítico para el tratamiento del cáncer. Los virus oncolíticos pueden usarse para tratar el cáncer administrando directamente el virus a un paciente, o infectando una célula con el virus y administrando la célula infectada al paciente para suministrar el virus. La célula para infectar por el virus puede ser una célula cancerosa del paciente. En algunos ejemplos, el cáncer para tratar es cáncer cerebral, tal como glioma maligno. Un ejemplo de un glioma maligno es glioblastoma. El virus oncolítico puede mostrar niveles 30 reducidos de neurotoxicidad.

El virus oncolítico puede ser una partícula vírica aislada capaz de producir un polinucleótido de ADNc que incluye una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 cuando el virus esté en una célula hospedadora.

35 El virus oncolítico puede ser una partícula vírica aislada que incluye un polinucleótido de ARN que incluye una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2.

40 El virus oncolítico puede ser una partícula vírica aislada que tiene un genoma que incluye fases abiertas de lectura que codifican: una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3, o una variante de la misma; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 4, o una variante de la misma; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 5, o una variante de la misma; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 6, o una variante de la misma; y una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7, o una variante de la misma.

45 La variante de una proteína de referencia puede ser una proteína que tenga una secuencia que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de la proteína de referencia, y en la que la proteína o variante mantiene la misma función biológica que la proteína de referencia.

50 En algunos ejemplos, al menos una de las fases abiertas de lectura codifica una proteína que tiene una secuencia que es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 y 7. En dichos ejemplos, la variante de una proteína de referencia puede ser una proteína que tenga una secuencia que sea al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de la proteína de referencia, y en la que la proteína variante mantiene la misma función biológica que la proteína de referencia.

55 El genoma vírico puede incluir fases abiertas de lectura que codifican: una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 4; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 5; una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 6; y una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7.

60 La partícula vírica aislada puede incluir además al menos una fase abierta de lectura adicional para codificar al menos una proteína adicional. La proteína adicional puede ser una proteína inmunogénica.

65 El virus oncolítico puede ser una partícula vírica aislada capaz de producir un polinucleótido de ADNc cuando el virus está en una célula hospedadora, teniendo el polinucleótido de ADNc una secuencia que incluye: SEQ ID NO: 8, o una variante conservativa de la misma; SEQ ID NO: 9, o una variante conservativa de la misma; 2894-3340 de SEQ ID NO: 10, o una variante conservativa de la misma; SEQ ID NO: 11 o una variante conservativa de la misma;

SEQ ID NO: 12, o una variante conservativa de la misma; y promotores de las mismas.

La variante conservativa de una secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de referencia de nucleótidos. La variante conservativa puede ser una secuencia que comprende una o más sustituciones silenciosas.

Una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación puede usarse para el tratamiento de cáncer. El cáncer puede ser un cáncer cerebral. El cáncer cerebral puede ser un glioblastoma. La partícula vírica aislada puede usarse para el tratamiento de cáncer infectando una célula con el virus y la célula infectada puede usarse para suministrar el virus a un paciente. Se analizan técnicas para infectar una célula con un virus y usar la célula infectada para suministrar el virus, por ejemplo en: Power AT, *et al.* Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther.* ene 2007; 15(1):123-30; y Tyler MA, *et al.* Neural stem cells target intracranial glioma to deliver an oncolytic adenovirus in vivo. *Gene Ther.* feb 2009; 16(2); 262-78.

Una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación puede usarse para inducir una respuesta inmunogénica en una persona a la que se administra el virus. La respuesta inmunogénica puede ser una respuesta antineoplásica. La partícula vírica aislada puede usarse para inducir una respuesta inmunogénica infectando una célula con el virus y la célula infectada puede usarse para suministrar el virus a la persona.

La partícula vírica aislada puede formularse para suministro directo al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo la partícula vírica aislada puede formularse para administración mediante inyección intratecal, intravenosa o intracraneal.

Una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación puede usarse en un método para tratamiento del cáncer, en el que el método incluye administrar una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación a un paciente que tenga cáncer. El cáncer puede ser un cáncer cerebral. El cáncer cerebral puede ser un glioblastoma. La partícula vírica aislada puede administrarse al paciente directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la partícula vírica aislada puede administrarse por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal. La partícula vírica aislada puede administrarse directamente al paciente o puede administrarse al paciente infectando una célula con el virus y administrando la célula infectada al paciente.

Una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación puede usarse en un método para inducir una respuesta inmunogénica en un paciente, en el que el método incluye administrar una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación al paciente. La partícula vírica aislada puede administrarse al paciente directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la partícula vírica aislada puede administrarse por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.

Una partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación puede incluirse en un kit para el tratamiento de cáncer en un paciente, incluyendo el kit: la partícula vírica aislada de acuerdo con la presente divulgación; e instrucciones para administración de la partícula vírica aislada al paciente. El cáncer puede ser un cáncer cerebral. El cáncer cerebral puede ser un glioblastoma. La partícula vírica aislada puede formularse para suministro directo al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo la partícula vírica aislada puede formularse para administración mediante inyección intratecal, intravenosa o intracraneal.

Un ejemplo de un rhabdovirus que se ha determinado que es eficaz en la destrucción de líneas celulares tumorales del SNC conservando al mismo tiempo la atenuación en astrocitos humanos normales y neuronas postmitóticas fue el rhabdovirus de Farmington (FMT). Véase Ejemplo 1 y Figura 1 para un análisis de los componentes genéticos del FMT. Resulta interesante que el FMT muestra poca o ninguna homología de secuencia con otros rhabdovirus de los seis géneros actuales y por lo tanto puede constituir un séptimo género en los Rhabdoviridae. Se ha determinado que este virus muestra neurotoxicidad reducida después de administración intracraneal (véase Ejemplo 2 y Figura 2). El virus FMT también demostró selectividad tumoral *in vitro* (véase Ejemplo 3 y Figura 3), y seguridad y eficacia después de administración intracraneal o sistémica en modelos de ratón singénicos y de xenoinjerto de glioblastoma (véase Ejemplo 4 y Figura 4).

Como se ha analizado anteriormente, se determinó que varios virus, incluyendo Maraba (MRB), Farmington (FMT) y Carajas (CRJ), tenían fuerte capacidad de destrucción contra una diversidad de líneas celulares cancerosas del panel de células NC60. También se determinó que estos virus tenían la capacidad de erradicar líneas celulares tumorales del SNC. Estos virus se ensayaron con respecto a su seguridad y eficacia *in vitro* e *in vivo*.

También se sabe que virus previos, tales como las cepas de tipo silvestre y atenuada de VSV, son fuertes destructores de líneas celulares del SNC. Sin embargo, son notablemente neurotóxicos y el tratamiento con dichos virus da como resultado con frecuencia pérdida de peso rápida y parálisis tras inyección intracerebral a dosis muy

bajas. Dicha neurotoxicidad evita la aplicación de VSV para tratar el cáncer cerebral.

Como se ilustra en el Ejemplo 2 y la Figura 2, se ha determinado que, como VSV, tanto CRJ como MRB también dan como resultado neurotoxicidad en ratones Balb/C en un periodo de 2-7 días después de la administración. Sin embargo, se ha determinado sorprendentemente que FMT no demostró neurotoxicidad hasta 30 días después de la inyección intracraneal directa (IC) de 1e6ufp.

Se determinó que FMT era capaz de destruir células GBM a bajas multiplicidades de infección, y se determinó que poseía cinética de replicación y grandes tamaños de estallido que rivalizaban con los del virus Maraba altamente lítico. También se determinó que FMT era escasamente citolítico en astrocitos humanos normales y neuronas primarias (véase Ejemplo 3 y Figura 3). El mecanismo de selectividad tumoral parece ser independiente de la señalización del interferón, como es actualmente el mecanismo establecido de selectividad que gobierna los agentes oncolíticos basados en rhabdovirus. FMT parece infectar células normales igualmente a células tumorales, pero solamente induce apoptosis en células tumorales. Se ha determinado que FMT no desencadena caspasa 8 en células normales, incluso aunque hay una síntesis de proteínas de virus robusta. Además, el mecanismo de citotoxicidad selectiva del FMT hizo al virus no neurotóxico a pesar de su fuerte capacidad para bloquear la producción de interferón (IFN). Esto indica que las infecciones por rhabdovirus del SNC no pueden controlarse eficazmente por defensas antivíricas de interferón cuando se suministran virus directamente al cerebro. Cuando se suministró por vía periférica, se determinó que FMT estaba tan atenuado como las cepas MR MG1 o deltaM51 de VSV modificadas técnicamente previamente publicadas.

Como se ilustra en el Ejemplo 4 y la Figura 4, el virus FMT puede usarse para tratar xenoinjerto humano y modelos singénicos inmunocompetentes por administración local regional o sistémica. La eficacia *in vivo* en un modelo U87MG ortotópico humano después de una única dosis IC o IV de FMT se describe en el Ejemplo 4. De hecho, IV incluso adquirió curas duraderas. Indudablemente ambos modos de suministro no son solamente capaces de tratar el glioma primario sino que también son capaces de tratar eficaz y duraderamente metástasis espinal U87MG en el 100 % de los animales. Basándose en estos resultados, se espera que el virus FMT pueda usarse para tratar otros cánceres, tales como, por ejemplo, meduloblastomas. Se espera que el virus FMT pueda usarse para tratar cánceres primarios así como cánceres metastatizados, tales como al SNC. Aunque el virus FMT muestra neurotoxicidad reducida y es, por esta razón, adecuado para su uso en el tratamiento de tumores neurológicos, debería entenderse que el virus FMT puede usarse para el tratamiento de cánceres no neurológicos. Debía entenderse también que otros virus de acuerdo con la presente divulgación podrían usarse para el tratamiento de cánceres no neurológicos.

Se ha demostrado que el virus FMT induce una inmunidad antitumoral. Como se ilustra en el Ejemplo 5 y la Figura 5, los ratones que albergaban previamente tumores CT-2A que se habían tratado con éxito con infusiones de virus FMT IC se inyectaron una segunda vez con células CT-2A directamente en el cerebro. Se determinó que ratones previamente curados rechazaron las células. Cuando, simultáneamente con el tratamiento de virus FMT, se retiraron linfocitos T citotóxicos (CTL) usando anticuerpos dirigidos hacia CD8, se determinó que en todos los ratones desprovistos de sus linfocitos T CD8+ volvieron a crecer con el tiempo las células CT-2A posteriormente inyectadas y la terapia fracasó. Esto sugiere que además de dirigir la lisis de células tumorales y de otros posibles mecanismos de acción, el virus FMT induce una inmunidad antitumoral cuando están presentes CTL. En consecuencia, se espera que un virus de acuerdo con la presente divulgación pueda usarse para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente expuesto al virus. La respuesta inmunitaria puede ser, por ejemplo, una respuesta inmunitaria antineoplásica.

Varios grupos han mostrado también eficacia impresionante en el modelo U87MG pero en pocas ocasiones en un modelo de GBM inmunocompetente singénico. Además, los modelos de GBM se tratan con frecuencia en tiempos predeterminados cuando los animales aún están sanos y los tumores son supuestamente pequeños. En los ejemplos analizados en el presente documento, el tratamiento comenzó 14 días después de la implantación, que es aproximadamente 4-7 días antes de que los animales presentaran síntomas de su enfermedad. En el modelo de GBG singénico de CT-2A ortotópico, el tratamiento comenzó en un estadio (19 días después de la implantación) en el que los animales comenzaron a presentar síntomas evidentes de enfermedad. Estos síntomas incluyen falta de acicalamiento, hidrocefalia y fenotipo encorvado. Se cree que este protocolo de tratamiento es particularmente relevante para la situación clínica en la que los pacientes se diagnostican y tratan después de presentar los síntomas. En los ejemplos analizados en el presente documento, se administró una dosis individual IC o 6 dosis IV de FMT. Los resultados demostraron un perfil de supervivencia similarmente significativo que conseguía una prolongación significativa de la supervivencia y varios ratones en cada grupo (20-30 %) se curaron de forma duradera más allá de 100 días. El modelo CT-2A se eligió porque dio como resultado un tumor infiltrante agresivo y comparte perfiles proliferativos, metabólicos, histológicos e inmunohistoquímicos observados en glioblastoma multiforme humano.

También se demostró que el virus FMT no distingue células tumorales de no tumorales mediante infectividad diferencial o producción de proteínas víricas (véase Ejemplo 6 y Figura 6). El virus FMT es productor de forma similar en células no cancerosas en comparación con cancerosas. El Ejemplo 6 también demostró que el genoma del virus FMT de tipo silvestre puede mutarse para incluir una proteína adicional, en el presente ejemplo la proteína

adicional añadida al genoma de virus FMT de tipo silvestre fue proteína verde fluorescente (GFP). Se demostró que el “virus rec-FMT-GFP” mutado resultante bloqueaba la respuesta de interferón de tipo I humano e infectaba de forma productiva células tanto cancerosas como no cancerosas.

- 5 También se demostró que el virus FMT inducía muerte celular de una manera dependiente del umbral antiapoptótico de las células infectadas y no de la productividad de la infección vírica dentro de la célula infectada (véase Ejemplo 7 y Figura 7). La infección vírica FMT de una célula parece iniciar la activación (escisión) de caspasa 8, caspasa 9, dominio de interacción con BH3 y polimerasa Poli(ADP-ribosa) en células tumorales.
- 10 En resumen, FMT es un virus oncolítico ejemplar de acuerdo con la presente divulgación, y que se ha demostrado que tiene un índice terapéutico alto contra líneas celulares de cáncer cerebral humano y muestras de pacientes *in vitro*, y que ha demostrado fuerte eficacia cuando se usa para tratar modelos preclínicos de cáncer cerebral. En consecuencia, se espera que puedan usarse partículas víricas aisladas de acuerdo con la presente divulgación para
- 15 tratar el cáncer, tal como cáncer cerebral (por ejemplo glioblastoma). También se espera que puedan usarse partículas víricas aisladas de acuerdo con la presente divulgación para inducir una respuesta inmunogénica, tal como una respuesta antineoplásica, en una persona a la que se administra el virus.

Secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos

- 20 Se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN y ARN) y secuencias de aminoácidos (por ejemplo, proteínas) que pueden usarse en una diversidad de métodos y técnicas conocidos por los expertos en la materia de la biología molecular. Estos incluyen formas aisladas, purificadas y recombinantes de las secuencias enumeradas e incluyen además formas completas o parciales de las secuencias enumeradas. Los usos no limitantes de secuencias de aminoácidos incluyen preparación de anticuerpos para
- 25 proteínas o péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos desveladas. Los usos no limitantes de las secuencias polinucleotídicas incluyen preparación de sondas de hibridación, como cebadores para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para mapeo de cromosomas y genes, y similares. Pueden usarse secuencias de aminoácidos o polinucleótidos completas o parciales en dichos métodos y técnicas.
- 30 La presente divulgación presenta la identificación de secuencias polinucleotídicas, incluyendo secuencias génicas y secuencias de ácido nucleico codificantes, y secuencias de aminoácidos. Además de las secuencias proporcionadas expresamente en el listado de secuencias adjunto, también se incluyen secuencias polinucleotídicas que están relacionadas estructural y/o funcionalmente. También se incluyen secuencias polinucleotídicas que hibridan en condiciones rigurosas con cualquiera de las secuencias polinucleotídicas en el listado de secuencias, o una
- 35 subsecuencia de las mismas (por ejemplo, una subsecuencia que comprende al menos 100 nucleótidos contiguos). Las secuencias polinucleotídicas también incluyen secuencias y/o subsecuencias configuradas para la producción y/o traducción de ARN, por ejemplo, ARNm, ARN antisentido, ARN con sentido, silenciamiento de ARN y configuraciones de interferencia, etc.
- 40 Pueden usarse secuencias polinucleotídicas que son sustancialmente idénticas a las proporcionadas en el listado de secuencias en las composiciones y los métodos desvelados en el presente documento. Se definen secuencias polinucleotídicas sustancialmente similares o sustancialmente idénticas como secuencias polinucleotídicas que son idénticas, nucleótido a nucleótido, con al menos una subsecuencia de un polinucleótido de referencia. Dichos polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, inserciones, supresiones y sustituciones en relación con cualquiera de
- 45 los enumerados en el listado de secuencias. Por ejemplo, dichos polinucleótidos son típicamente al menos aproximadamente 70 % idénticos a un polinucleótido de referencia seleccionado de los del listado de secuencias, o una subsecuencia del mismo. Por ejemplo, al menos 7 de 10 nucleótidos dentro de una ventana de comparación son idénticos a la secuencia de referencia seleccionada. Además, dichas secuencias pueden ser al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos
- 50 aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,5 %, idénticas a la secuencia de referencia. Las subsecuencias de estos polinucleótidos pueden incluir al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente
- 55 100, al menos aproximadamente 500, aproximadamente 1000 o más, nucleótidos contiguos o subsecuencias complementarias. Dichas subsecuencias pueden ser, por ejemplo, oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos aislados o genes de longitud completa o ADNc. Se incluyen secuencias polinucleotídicas complementarias de cualquiera de las secuencias descritas.
- 60 Las secuencias de aminoácidos incluyen las secuencias de aminoácidos representadas en el listado de secuencias, y subsecuencias de las mismas. También se incluyen secuencias de aminoácidos que están muy relacionadas estructural y/o funcionalmente. Por ejemplo, además de las secuencias de aminoácidos en el listado de secuencias, pueden usarse secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas en las composiciones y los métodos desvelados. Las secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas o sustancialmente similares se definen como
- 65 secuencias de aminoácidos que son idénticas aminoácido a aminoácido, con al menos una subsecuencia de una secuencia de aminoácidos de referencia. Dichas secuencias de aminoácidos pueden incluir, por ejemplo,

inserciones, supresiones y sustituciones en relación con cualquiera de las secuencias de aminoácidos en el listado de secuencias. Por ejemplo, dichos aminoácidos son típicamente al menos aproximadamente 70 % idénticos a una secuencia de aminoácidos de referencia, o una subsecuencia de la misma. Por ejemplo, al menos 7 de 10 aminoácidos dentro de una ventana de comparación son idénticos a la secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada. Frecuentemente, dichas secuencias de aminoácidos son al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,5 %, idénticas a la secuencia de referencia. Las subsecuencias de las secuencias de aminoácidos pueden incluir al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 500, aproximadamente 1000 o más, aminoácidos contiguos. También son posibles variantes conservativas de secuencias o subsecuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos pueden ser inmunogénicas, enzimáticamente activas, enzimáticamente inactivas y similares.

Cuando las secuencias polinucleotídicas se traducen para formar un polipéptido o subsecuencia de un polipéptido, los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales funcionalmente similares. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. La Tabla 1 expone ejemplos de seis grupos que contienen aminoácidos que son "sustituciones conservativas" entre sí. Están disponibles en la técnica otros diagramas de sustituciones conservativas, y pueden usarse de una manera similar.

Tabla 1

Grupo de Sustitución Conservativa

1	Alanina (A)	Serina (S)	Treonina (T)
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)	
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)	
4	Arginina (R)	Lisina (K)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M) Valina (V)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (I)	Triptófano (W)

Un experto en la materia apreciará que muchas sustituciones conservativas producen construcciones funcionalmente idénticas. Por ejemplo, como se ha analizado anteriormente, debido a la degeneración del código genético, las "sustituciones silenciosas" (es decir, sustituciones en una secuencia polinucleotídica que no dan como resultado una alteración en un polipéptido codificado) son una característica implícita de cada secuencia polinucleotídica que codifica un aminoácido. De forma similar, "sustituciones de aminoácidos conservativas" en uno o algunos aminoácidos en una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 % o más) se sustituyen con aminoácidos diferentes con propiedades muy similares, y también se identifican fácilmente como muy similares a una construcción desvelada. Dichas variaciones conservativas de cada secuencia desvelada también se contemplan.

Se conocen ampliamente en la técnica métodos para obtener variantes conservativas, así como versiones más divergentes de las secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos. Además de homólogos de origen natural que pueden obtenerse, por ejemplo, explorando bibliotecas genómicas o de expresión de acuerdo con cualquiera de una diversidad de protocolos bien establecidos, véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (suplementado hasta 2004) John Wiley and Sons, Nueva York ("Ausubel"); Sambrook *et al.* Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 ("Sambrook") y Berger y Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, California ("Berger"), pueden producirse variantes adicionales por cualquiera de una diversidad de procedimientos de mutagénesis. Muchos de dichos procedimientos se conocen en la técnica, incluyendo mutagénesis dirigida, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos y muchos otros. Por ejemplo, se describe la mutagénesis dirigida, por ejemplo, en Smith (1985) "In mutagenesis in vitro" Ann. Rev. Genet. 19: 423-462, y referencias en la misma, Botstein y Shortle (1985) "Strategies and applications of mutagenesis in vitro" Science 229: 1193-1201; y Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" Biochem. J. 237: 1-7. Se describe la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, por ejemplo, en Zoller y Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" Nucleic Acids Res. 10: 6487-6500. Se describe la mutagénesis usando bases modificadas, por ejemplo, en Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, y Taylor *et al.* (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787. Se describe la mutagénesis usando ADN bicatenario con huecos,

por ejemplo, en Kramer *et al.* (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" Nucl. Acids Res. 12: 9441-9460). Se describe la mutagénesis de desapareamiento puntual, por ejemplo, en Kramer *et al.* (1984) "Point Mismatch Repair" Cell 38: 879-887). Se describe la mutagénesis de rotura bicatenaria, por ejemplo, en Mandecki (1986) "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7177-7181, y en Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinión in Biotechnology 4: 450-455). Se describe la mutagénesis usando cepas hospedadoras deficientes en reparación, por ejemplo, en Carter *et al.* (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443. Se describe la mutagénesis por síntesis génica total, por ejemplo, en Nambiar *et al.* (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" Science 223: 1299-1301. Se describe la redistribución de ADN, por ejemplo, en Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" Nature 370: 389-391, y Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentaron and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751.

Muchos de los métodos anteriores se describen adicionalmente en Methods in Enzymology Volumen 154, que también describe controles útiles para dificultades en la resolución de problemas con diversos métodos de mutagénesis. También están disponibles en el mercado kits para mutagénesis, construcción de bibliotecas y otros métodos de generación de diversidad. Por ejemplo, están disponibles kits de, por ejemplo, Amersham International pie (Piscataway, N. J.) (por ejemplo, usando el método de Eckstein anterior), Bio/Can Scientific (Mississauga, Ontario, CANADÁ), Bio-Rad (Hercules, Calif.) (por ejemplo, usando el método de Kunkel descrito anteriormente), Boehringer Mannheim Corp. (Ridgefield, Connecticut), Clontech Laboratories of BD Biosciences (Palo Alto, CA), DNA Technologies (Gaithersburg, Md), Epicenter Technologies (Madison, Wis.) (por ejemplo, el kit 5 prima 3 prima); Genpak Inc. (Stony Brook, NY), Lemarg Inc (Toronto, CANADÁ), Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.), Pharmacia Biotech (Peapack, N. J.), Promega Corp. (Madison, Wis.), QBiogene (Carlsbad, Calif.) y Stratagene (La Jolla, Calif.) (por ejemplo, kit de mutagénesis dirigida QuickChange.TM. y kit de mutagénesis dirigida, bicatenaria, Chameleon.TM.).

Determinación de relaciones de secuencias

Pueden determinarse objetivamente secuencias similares por cualquier variedad de métodos, por ejemplo, porcentaje de identidad, hibridación, inmunológicamente, y similares. Están disponibles y se conocen en la técnica una diversidad de métodos para determinar relaciones entre dos o más secuencias (por ejemplo, identidad, similitud y/u homología). Los métodos incluyen alineamiento manual, alineamiento de secuencias asistido por ordenador y combinaciones de los mismos, por ejemplo. Un experto en la materia puede producir varios algoritmos (que se implementan generalmente por ordenador) para realizar alineamiento de secuencias, o están estos ampliamente disponibles. Estos métodos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Mates. 2: 482; el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443; el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444; y/o por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.).

Por ejemplo, se describe software para realizar análisis de identidad de secuencias (y similitud de secuencias) usando el algoritmo BLAST en Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. Este software está públicamente disponible, por ejemplo, a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en Internet en ncbi.nlm.nih.gov. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden con o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra adyacente. Estos aciertos de palabra adyacentes iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, en la medida en que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada desciende en la cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de una de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un punto de corte de 100, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP (BLAST de Proteínas) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl Acad Sci. USA 89: 10915).

Adicionalmente, el algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de menor suma ($p(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia (y, por lo tanto, en este contexto, homólogo) si la probabilidad de menor suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1 o menor de aproximadamente 0,01, y/o incluso menor de aproximadamente 0,001.

Otro ejemplo de un algoritmo de alineamiento de secuencias es PILEUP, que crea un alineamiento de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos, por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35: 351-360. El método usado es similar al método descrito en Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-153. El programa puede alinear, por ejemplo, hasta 300 secuencias de una longitud máxima de 5.000 letras. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo puede después alinearse con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Pueden alinearse dos grupos de secuencias por una extensión sencilla del alineamiento por pares de dos secuencias individuales. El alineamiento final se consigue mediante una serie de alineamientos progresivos, por pares. El programa también puede usarse para representar un dendograma o representación en árbol de relaciones de agrupamiento. El programa se procesa designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias.

Un ejemplo adicional de un algoritmo que es adecuado para múltiples alineamientos de secuencias de ADN, o aminoácidos, es el programa CLUSTALW (Thompson, J. D. *et al.* (1994) *Nucl. Acids, Res.* 22: 4673-4680). CLUSTALW realiza múltiples comparaciones por pares entre grupos de secuencias y los ensambla en un alineamiento múltiple basado en homología. Las penalizaciones de apertura de hueco y extensión de hueco pueden ser, por ejemplo, 10 y 0,05 respectivamente. Para alineamientos de aminoácidos, puede usarse el algoritmo BLOSUM como una matriz de peso de proteínas. Véase, por ejemplo, Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919.

También puede evaluarse la similitud de hibridación de polinucleótidos por hibridación entre ácidos nucleicos monocatenarios (o regiones monocatenarias de ellos) con secuencias polinucleotídicas complementarias o parcialmente complementarias. La hibridación es una medida de la asociación física entre ácidos nucleicos, típicamente, en solución, o con una de las cadenas de ácido nucleico inmovilizadas en un soporte sólido, por ejemplo, una membrana, una perla, una microplaca, un filtro, etc. Se produce hibridación de ácido nucleico basándose en una diversidad de fuerzas físico-químicas bien caracterizadas, tales como enlaces de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilación de bases y similares. Se conocen bien en la técnica numerosos protocolos para hibridación de ácido nucleico. Se encuentra una guía exhaustiva de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," (Elsevier, N. Y.), así como en Ausubel *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology* (suplementado hasta 2004) John Wiley and Sons, Nueva York ("Ausubel"); Sambrook *et al.* *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª Ed), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 ("Sambrook"), y Berger y Kimmel *Guide to Molecular Cloning Techniques*, *Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. ("Berger"). Hames y Higgins (1995) *Gene Probes* 1, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 1) y Hames y Higgins (1995) *Gene Probes* 2, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 2) proporcionan detalles sobre la síntesis, el marcaje, la detección y la cuantificación de ADN y ARN, incluyendo oligonucleótidos.

Se seleccionan condiciones adecuadas para obtener hibridación, incluyendo hibridación diferencial, de acuerdo con la temperatura de fusión teórica (T_m) entre ácidos nucleicos complementarios y parcialmente complementarios. En un conjunto de condiciones dado, por ejemplo, composición de disolvente, fuerza iónica, etc., la T_m es la temperatura a la que la doble cadena entre las cadenas de ácido nucleico hibridantes se desnaturaliza al 50 %. Es decir, T_m corresponde a la temperatura correspondiente al punto medio en la transición de hélice a bucle aleatorio; depende de la longitud de los polinucleótidos, la composición de nucleótidos y la fuerza iónica, para tramos largos de nucleótidos.

Después de la hibridación, pueden retirarse los ácidos nucleicos no hibridados por una serie de lavados, cuya rigurosidad puede ajustarse dependiendo de los resultados deseados. Las condiciones de lavado de baja rigurosidad (por ejemplo, usando mayor salinidad y menor temperatura) aumentan la sensibilidad, pero pueden producir señales de hibridación no específicas y altas señales de fondo. Las condiciones de mayor rigurosidad (por ejemplo, usando menor salinidad y mayor temperatura es más cercana a la T_m) reducen la señal de fondo, típicamente principalmente con la señal específica restante. Véase, también, Rapley, R. y Walker, JM eds., *Molecular Biomethods Handbook* (Humana Press, Inc., 1998).

Las “condiciones de lavado de hibridación rigurosas” o “condiciones rigurosas” en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico, tales como hibridaciones de Southern y Northern, dependen de la secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Se encuentra una guía exhaustiva de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993), mencionado anteriormente, y en Hames y Higgins 1 y Hames y Higgins 2, mencionado anteriormente.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es SSC 2x, formamida 50 % a 42 °C, llevándose a cabo la hibridación durante una noche (por ejemplo, durante aproximadamente 20 horas). Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de SSC 0,2x a 65 °C durante 15 minutos (véase Sambrook, mencionado anteriormente para una descripción de tampón de SSC). Con frecuencia, el lavado que determina la rigurosidad se precede de un lavado de baja rigurosidad para retirar la señal debida a sonda no hibridada residual. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad es SSC 2x a temperatura ambiente (por ejemplo, 20 °C durante 15 minutos).

En general, una relación de señal con respecto a ruido de al menos 2,5x-5x (y típicamente mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. La detección de al menos hibridación rigurosa entre dos secuencias indica similitud estructural relativamente fuerte a las proporcionadas en los listados de secuencias del presente documento.

En general, las condiciones de lavado e hibridación “altamente rigurosas” se seleccionan para ser aproximadamente 5 °C o menos menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos (como se indica posteriormente, las condiciones altamente rigurosas también pueden referirse en términos comparativos). Pueden identificarse secuencias diana que están estrechamente relacionadas o son idénticas a la secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, “sonda”) en condiciones rigurosas o altamente rigurosas. Las condiciones rigurosas menores son apropiadas para secuencias que son menos complementarias

Por ejemplo, la determinación de las condiciones de lavado e hibridación rigurosas o altamente rigurosas (o hibridación aún más rigurosa), la rigurosidad de las condiciones de hibridación y lavado se aumenta gradualmente (por ejemplo, aumentando la temperatura, reduciendo la concentración salina, aumentando la concentración de detergente y/o aumentando la concentración de disolventes orgánicos, tales como formamida, en la hibridación o el lavado), hasta que se cumple un conjunto de criterios seleccionado. Por ejemplo, la rigurosidad de las condiciones de hibridación y lavado se aumenta gradualmente hasta que una sonda que comprende una o más de las secuencias polinucleotídicas presentes, o una subsecuencia de las mismas, y/o secuencias polinucleotídicas complementarias de las mismas, se une con una diana perfectamente coincidente complementaria, con una relación de señal con respecto a ruido que es al menos 2,5x, y opcionalmente 5x, 10x o 100x o más, tan alta como la observada para hibridación de la sonda con una diana no coincidente, según se desee.

Usando subsecuencias derivadas de los ácidos nucleicos enumerados en el listado de secuencias, pueden obtenerse ácidos nucleicos diana nuevos; dichos ácidos nucleicos diana también son una característica de la invención. Por ejemplo, dichos ácidos nucleicos diana incluyen secuencias que hibridan en condiciones rigurosas con una sonda oligonucleotídica que corresponde a una subsecuencia única de cualquiera de los polinucleótidos en el listado de secuencias, o una secuencia complementaria de la misma; la sonda codifica opcionalmente una subsecuencia única en cualquiera de las secuencias de aminoácidos del listado de secuencias.

Por ejemplo, se eligen las condiciones de hibridación en las que un oligonucleótido diana que es perfectamente complementario de la sonda oligonucleotídica hibrida con la sonda con una relación de señal con respecto a ruido al menos aproximadamente 5-10 veces mayor que para la hibridación del oligonucleótido diana con un ácido nucleico no complementario de control negativo. Puede conseguirse mayores relaciones de señal con respecto a ruido aumentando la rigurosidad de las condiciones de hibridación de modo que se obtengan relaciones de aproximadamente 15x, 20x, 30x, 50x o más. La señal particular dependerá del marcador usado en el ensayo relevante, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador calorimétrico, un marcador radiactivo o similar.

Vectores, promotores y sistemas de expresión

Las secuencias polinucleotídicas de la presente divulgación pueden estar en cualquiera de una diversidad de formas, por ejemplo, casetes de expresión, vectores, plásmidos, partículas víricas o secuencias de ácido nucleico lineales. Por ejemplo, los vectores, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), YAC (cromosomas artificiales de levadura), fagos, virus y segmentos de ácido nucleico pueden comprender las secuencias de ácido nucleico presentes o subsecuencias de las mismas. Estas construcciones de ácido nucleico pueden incluir adicionalmente promotores, potenciadores, polienlazadores, genes reguladores, etc. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere, por ejemplo, a vectores que comprenden los polinucleótidos desvelados en el presente documento, células hospedadoras que incorporan estos vectores, y la producción de los diversos polipéptidos desvelados (incluyendo los que están en el listado de secuencias) por técnicas recombinantes.

De acuerdo con estos aspectos, el vector puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico, un vector de fago mono o bicatenario, o un vector vírico de ARN o ADN mono o bicatenario. Dichos vectores pueden introducirse en células como polinucleótidos, preferentemente ADN, por técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en células. Los vectores, en el caso de vectores de fagos y víricos, también pueden introducirse y preferentemente se introducen en células como virus envasados o encapsidados por técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores víricos pueden ser competentes en replicación o defectuosos en replicación. En el último caso, la propagación vírica se producirá en general solamente en células hospedadoras complementarias.

En algunos ejemplos, los vectores incluyen los útiles para expresión de polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención. En general, dichos vectores comprenden regiones de control de acción en cis eficaces para expresión en un hospedador, unidas operativamente con el polinucleótido para expresar. Los factores de acción en trans apropiados los provee el hospedador, los provee un vector complementario o los provee el vector en sí mismo tras la introducción al hospedador.

En ciertos ejemplos a este respecto, los vectores proporcionan expresión de proteínas. Dicha expresión preferida puede ser expresión inducible, expresión temporalmente limitada o expresión restringida predominantemente a ciertos tipos de células, o cualquier combinación de las anteriores. Algunas realizaciones de vectores inducibles pueden inducirse por expresión por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como temperatura y aditivos nutrientes. Los expertos en la materia conocen bien y emplean rutinariamente una diversidad de vectores adecuados para este aspecto, incluyendo vectores de expresión constitutiva e inducible para su uso en hospedadores procariontes y eucariotas. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como rhabdovirus, baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos y binarios usados para transformaciones mediadas por *Agrobacterium*.

Los vectores pueden incluir un marcador seleccionable y un gen indicador. Para facilitar la obtención de suficientes cantidades de vector, puede usarse un origen bacteriano que permita la replicación en *E. coli*. Los siguientes vectores, que están disponibles en el mercado, se proporcionan como ejemplo. Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias están pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Los vectores binarios vegetales útiles incluyen BIN19 y sus derivados disponibles de Clontech. Estos vectores se enumeran solamente como ilustración de los muchos vectores disponibles en el mercado y bien conocidos que están disponibles para los expertos en la materia. Se apreciará que puede usarse cualquier otro plásmido o vector adecuado para, por ejemplo, introducción, mantenimiento, propagación o expresión de uno o más polinucleótidos y/o polipéptidos como se proporcionan en el listado de secuencias presente, incluyendo variantes de los mismos como se describe, en un hospedador.

En general, las construcciones de expresión contendrán sitios para inicio y terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para traducción cuando la construcción codifica un polipéptido. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirá una AUG de inicio de la traducción en el inicio y un codón de terminación situado apropiadamente al final del polipéptido para traducir. Además, las construcciones pueden contener regiones de control que regulan así como generan expresión. En general, de acuerdo con muchos procedimientos practicados habitualmente, dichas regiones actuarán controlando la transcripción, tal como factores de transcripción, sitios de unión a represores y señales de terminación, entre otros. Para secreción de una proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, al espacio periplásmico o al ambiente extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas al polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas del polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

La transcripción del ADN (por ejemplo, que codifica los polipéptidos) de la presente invención por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Son potenciadores elementos de acción en cis del ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula hospedadora dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que se localiza en el sitio tardío del origen de replicación en pb 100 a 270, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Los potenciadores adicionales útiles en la invención para aumentar la transcripción del segmento de ADN introducido incluyen, entre otros, potenciadores víricos tales como los que están dentro del promotor de 35S, como se muestra en Odell *et al.*, Plant Mol. Biol. 10: 263-72 (1988), y un potenciador de un gen de opina como se describe en Fromm *et al.*, Plant Cell 1: 977 (1989). El potenciador puede afectar a la especificidad tisular y/o especificidad temporal de expresión de secuencias incluidas en el vector.

Las regiones de terminación también facilitan la expresión eficaz por terminación de la transcripción en puntos apropiados. Los terminadores útiles incluyen, pero sin limitación, pinll (véase An *et al.*, Plant Cell 1(1)115-122 (1989)), gbl (véase Referencia de Genbank n.º L22345), gz (véase terminador gzw64a, Referencia de Genbank n.º S78780) y el terminador nos de *Agrobacterium*. La región de terminación puede ser nativa con la secuencia de nucleótidos del promotor, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés, o puede derivar de otra fuente. Por ejemplo, otras regiones de terminación convenientes están disponibles del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Véase también: Guerineau *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671-674; Sanfacon *et al.* (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen *et al.* (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe *et al.* (1990) Gene 91: 151-158; Bailas *et al.* 1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; y Joshi *et al.* (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

Entre los promotores eucariotas conocidos adecuados para expresión generalizada están el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa del VHS, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovíricas, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("VSR"), promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína I de ratón y diversos promotores vegetales, tales como globulina 1. También pueden usarse los promotores nativos de las secuencias polinucleotídicas enumeradas en el listado de secuencias. Los representantes de promotores procariotas incluyen el promotor PL de fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli* por nombrar solamente algunos de los promotores bien conocidos.

También se contemplan virus aislados o recombinantes, células infectadas por virus o células que incluyen una o más partes de las presentes secuencias polinucleotídicas y/o que expresan una o más partes de las presentes secuencias de aminoácidos.

Un polinucleótido, que codifica opcionalmente la secuencia estructural heteróloga de una secuencia de aminoácidos como se desvela, se insertará en general en un vector usando técnicas convencionales de modo que esté unido operativamente con un promotor para expresión. Unido operativamente, como se usa en el presente documento, incluye referencia a un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la secuencia promotora inicia y media en la transcripción del ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, unido operativamente significa que la secuencia polinucleotídica que se une es contigua y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contigua y en la misma fase de lectura. Cuando se pretende que el polinucleótido sea para expresión de un polipéptido, el polinucleótido se situará de modo que el sitio de inicio de la transcripción se localice aproximadamente 5' de un sitio de unión a ribosoma. El sitio de unión a ribosoma estará 5' del AUG que inicia la traducción del polipéptido para expresar. En general, no habrá ninguna otra fase abierta de lectura que comience con un codón de inicio, habitualmente AUG, y quede entre el sitio de unión a ribosomas y el codón de inicio. También, en general, habrá un codón de terminación de la traducción al final del polipéptido y habrá una señal de poliadenilación en construcciones para su uso en hospedadores eucariotas. También pueden incluirse en la construcción polinucleotídica señales de terminación de la transcripción dispuestas apropiadamente en el extremo 3' de la región transcrita.

Para construcciones de ácido nucleico diseñadas para expresar un polipéptido, los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5'. Dichas secuencias líder pueden actuar para potenciar la traducción. Se conocen en la técnica líderes de traducción e incluyen: líderes de picornavirus, por ejemplo: líder de EMCV (región no codificante 5' de Encefalomiocarditis), Elroy-Stein *et al.* (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6126-6130; líderes de potivirus, por ejemplo, líder de TEV (Virus del Grabado del Tabaco), Allison *et al.* (1986); líder de MDMV (Virus del Mosaico Enano del Maíz), Virology 154: 9-20; proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP), Macejake *et al.* (1991) Nature 353: 90-94; líder no traducido del ARNm de proteína de cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), Jobling *et al.* (1987) Nature 325: 622-625; líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), Gallie *et al.* (1989) Molecular Biology of RNA, páginas 237-256; y líder de virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) Lommel *et al.* (1991) Virology 81: 382-385. Véase también Della-Cioppa *et al.* (1987) Plant Physiology 84: 965-968. El casete también puede contener secuencias que potencian la traducción y/o estabilidad de ARNm, tales como intrones. El casete de expresión también puede incluir en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos aislada de interés, una región de terminación de la traducción.

En los casos en los que sea deseable tener el producto expresado de la secuencia polinucleotídica dirigida a un orgánulo particular o secretada en la superficie de la célula el casete de expresión puede comprender además una secuencia codificante para un péptido de tránsito. Dichos péptidos de tránsito se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación: el péptido de tránsito para la proteína transportadora de acilo. La subunidad pequeña de la RUBISCO, EPSP sintasa de planta y similares.

En la preparación de un casete de expresión, los diversos fragmentos de ADN pueden manipularse para proporcionar las secuencias polinucleotídicas en la orientación apropiada y, según sea apropiado, en la fase de lectura apropiada. Para este fin, pueden emplearse adaptadores o enlazadores para unir fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, retirada de ADN superfluo, retirada de sitios de restricción o similares. Para este fin, pueden emplearse mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, digestiones de restricción, hibridación y resustituciones tales como transiciones y transversiones.

Puede efectuarse introducción de una construcción en una célula hospedadora por transfección de fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga de raspado, introducción balística, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales tales como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, (1986) y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como estreptococos, estafilococos, *E. coli*, estreptomicas y células de *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como CHO, COS y células de melanoma de Bowes; y células vegetales.

Las células hospedadoras pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales, que pueden modificarse según sea apropiado para, entre otros, activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión generalmente serán adecuadas para la expresión de ácidos nucleicos y/o polipéptidos, como resultará evidente para los expertos en la materia. Las proteínas maduras pueden expresarse en células de mamífero, levadura, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir dichas proteínas usando ARN derivados de los polinucleótidos desvelados en el presente documento.

Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, cuando el promotor seleccionado es inducible se induce por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o exposición a inductor químico) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Las células típicamente se recogen después por centrifugación, se alteran por medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante se conserva para purificación adicional. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, ultrasonidos, rotura mecánica, o uso de agentes de lisado celular; dichos métodos se conocen bien por los expertos en la materia.

Las composiciones y métodos de la presente divulgación pueden incluir administración de los polinucleótidos y/o aminoácidos como se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, los tratamientos para glioblastoma pueden incluir administrar uno o más de los polinucleótidos y/o aminoácidos. El o los polinucleótidos y/o aminoácidos pueden estar en una forma aislada o pueden ser parte de una composición, incluyendo una partícula vírica. En diversas realizaciones, la administración puede tomar las siguientes formas: administración intradérmica, transdérmica, parenteral, intravascular, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, regional, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravesical, intratumoral, de inhalación, de perfusión, de lavado, de inyección directa, alimentaria, oral o intracraneal.

Materiales y métodos

Líneas celulares: U87MG, U343, U373, SF268, SF265, SF539, SNB19, SNB75, Vero, U118, astrocitos humanos normales (AHN), CT-2A, DBT, GL261 y fibroblastos primarios GM38 humanos (National Institute of General Medical Sciences Mutant Cell Repository, Camden, NJ) se propagaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Hyclone, Logan, UT) complementado con suero de ternero fetal 10 % (Cansera, Etobicoke, Ontario, Canadá).

Ensayos de viabilidad: las líneas celulares indicadas se sembraron a una densidad de 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente las células se infectaron con el rMarabaWT, o FMT a diversas multiplicidades de infección (0,0001-10 ufp/célula). Después de una incubación de 48 horas se añadió Alamar Blue (sal sódica de resazurina (Sigma-Aldrich)) a una concentración final de 20 µg/ml. Después de una incubación de 6 horas, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 573 nm.

Ensayos de placa: se sembraron células Vero a una densidad de 5e5 células por pocillo de una placa de 6 pocillos. Al día siguiente se prepararon 100 l de diluciones víricas en serie y se añadieron durante 1 hora a células Vero. Después de adsorción vírica se añadieron 2 ml de superposición de agarosa (agarosa 1 %:DMEM 2X 1:1 y FCS 20 %). Las placas se contaron al día siguiente.

Bioensayo de interferón: se infectaron células PC-3 con rMarabaWT, AM51 o FMT, a una multiplicidad de infección de 3 ufp/célula durante 24 horas. Al día siguiente el sobrenadante se neutralizó con ácido con HCl 0,25 N durante una noche a 4 °C seguido de la adición de NaOH 0,25 para ajustar el pH a 7. Las células Vero se incubaron con el sobrenadante neutralizado durante 24 horas e infectaron posteriormente rMaraba WT con una multiplicidad de infección que varió de 0,0001 a 100 ufp/célula. Cualquier interferón secretado por las células PC-3 en respuesta a Maraba o los mutantes atenuados protegería posteriormente las células Vero de infección con Maraba. Después de 24 horas, la supervivencia se cuantificó usando un ensayo de violeta cristal. Brevemente las células se incubaron con solución de violeta cristal 1 %, se lavaron, se secaron, se resuspendieron en SDS 1 % y se leyeron a una longitud de onda de 595 nm.

Determinación de la toxicidad *in vivo*: para la vía de administración (vda) intracraneal (IC), se proporcionó a grupos de ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad ($n = 5/\text{grupo}$) una única infusión IC de los virus indicados en incrementos logarítmicos por grupo que variaba de 10^2 a 10^7 ufp. Para la vda intravenosa (IV), se proporcionó a grupos de cinco ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad una única inyección IV de los virus indicados en la vena de la cola, en incrementos semilogarítmicos por grupo que variaba de 3×10^6 a 3×10^9 ufp, diluido en 100 μl por inyección. Después de inyecciones IC o IV, los ratones se supervisaron diariamente con respecto a señales de malestar incluyendo pérdida de peso, piloerección, parálisis de las extremidades posteriores y dificultad respiratoria. La dosis mediana letal (DL50) se calculó usando el método de Spearman Karber, mientras que la dosis tolerable máxima (DTM) se indicó como la dosis más alta que no da como resultado la muerte de un solo animal.

Imágenes de glioblastoma en un modelo animal: se adaptaron células U87MG y CT2A para captura de imágenes bioluminiscentes transduciendo con lentivirus que contenía luciferasa de luciérnaga (FLUC) y transfectando con plásmido de FLUC, respectivamente. Se inyectaron células U87MG FLUC y CT2A FLUC IC en CD1 desnudos y C57BL/6 respectivamente. Los animales con tumores que expresaban FLUC se supervisaron con respecto a progresión tumoral usando el sistema de captura de imágenes *in vivo* IVIS Xenogen 200 después de una inyección IP de luciferina (Gold Biotechnology Inc). Los animales se supervisaron con respecto a señales de malestar incluyendo supervivencia, pérdida de peso, morbilidad, piloerección, parálisis de las extremidades posteriores y dificultad respiratoria.

Modelos tumorales de glioblastoma singénico de ratón: se establecieron tumores cerebrales por una única inyección estereotáctica con células de glioma de ratón CT-2A en animales C57BL/6 de 6-8 semanas de edad. Cinco días después de la inyección- El día 19 los ratones C57BL/6 que portaban tumores CT-2A se trataron IV con 6 dosis de FMT (5×10^8 ufp/dosis tres veces por semana) o se les inyectó por vía estereotáctica FMT (2×10^7 en un volumen de 50 μl) usando una bomba de infusión (velocidad = 3 $\mu\text{l}/\text{min}$). Algunos animales C57BL/6 se sacrificaron el día 19 y se capturaron imágenes en un microscopio de disección Nikon. Los animales restantes se supervisaron para supervivencia.

Modelo de xenoinjerto de glioblastoma humano: se adaptaron células U87MG ováricas humanas para captura de imágenes bioluminiscentes momento en el cual se inyectaron 1×10^6 células U87MG IC en ratones desnudos CD-1 atímicos de 6-8 semanas de edad. Los animales CD-1 no tratados desarrollan tumores aproximadamente el día 15-21. Los ratones se trataron con una única inyección intravenosa (vena de la cola) realizada el día 14 con FMT (5×10^8), o se trataron IC con los mismos virus a una dosis de 2×10^7 ufp. Los animales se supervisaron con respecto a supervivencia y con respecto a señales de malestar incluyendo pérdida de peso, morbilidad, piloerección, parálisis de las extremidades posteriores y dificultad respiratoria. Se capturaron imágenes tumorales con un sistema Xenogen 200 IVIS (Caliper LS, EE.UU.).

Rotorod: se ensayaron ratones Balb/C con respecto a función/rendimiento motor en un aparato de varilla rotatoria antes de la administración vírica IC. Los ratones se colocaron en un rotorod durante 3 ensayos al día durante 4 días consecutivos. Después de permitir a los animales 0,5 minutos para ajustarse al aparato, se aceleró la varilla de una manera lineal a 0,1 rpm/s. Se midió el tiempo hasta la caída en minutos. Los animales se dividieron en grupos de 3. La función motora una semana después de cirugía en animales tratados IC con PBS y FMT y no inyectados (sin tratamiento previo). Se calculó el error típico de la media.

Secuenciación de ácidos nucleicos: se realizó secuenciación de FMT en el Instituto de Ontario para la investigación del Cáncer (Toronto, Canadá) en ADNc de FMT que se generó usando un enfoque de secuenciación aleatoria con hexámeros aleatorios en ARN de FMT extraído con trizol y purificado por RNeasy.

Secuenciación de proteínas: se amplificó el virus FMT en células Vero hasta alta titulación ($\sim 10^{11}$ ufp/ml), se purificó y se lisó con tampón de muestra Laemmli 5 x (Tris-Cl 60 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0,01 %) y se separaron en geles de SDS-PAGE 12 %. Los geles de repetición se tiñeron con azul de coomasie o plata, y se extrajeron nueve bandas para secuenciación de péptidos.

Fabricación y rescate de virus FMT recombinante: se produjo FMT recombinante como se ha descrito recientemente para virus Maraba25. Brevemente, se amplificó ADN complementario (ADNc) de virus FMT en tres reacciones de RT-PCR separadas produciendo fragmentos solapantes que se unieron entre sí usando sitios de restricción internos. El ADNc de ~ 11 Kb de longitud completa se clonó después en un vector LC-KAN modificado (Lucigen, Middleton, WI) que portaba un promotor T7 cadena arriba de la secuencia líder antigenómica 5' e inmediatamente cadena abajo del terminador 3' una ribozima de virus delta de hepatitis modificado y secuencia señal de terminación de polimerasa T7. Se infectaron células de carcinoma de pulmón A549 sembradas a $3,0 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos 24 horas después con virus vaccinia ($\text{moi} = 10$) que expresaba la ARN polimerasa T7 37 en medio OptiMem durante 1,5 horas. Después de la retirada del virus vaccinia, cada pocillo se transfectó con LC-KAN FMT (2 μg) junto con construcciones pCI-Neo que codificaban FMT "N" (1 μg), "P" (1,25 μg) y L (0,25 μg) con lipofectamine 2000 (5 μl por pocillo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El reactivo de transfección se retiró 5 horas después y se reemplazó con DMEM que contenía HI-FBS 10 %. A las 48 horas después de la transfección, se recogió el medio (agrupado de dos placas), se filtró (0,2 μm) para retirar el virus vaccinia contaminante y se usó 1 ml para infectar células de glioblastoma SNB19 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Los efectos citopáticos y la expresión de

GFP visible 24-48 horas después fueron indicativos de un rescate exitoso. El FMT recombinante experimentó tres ciclos de purificación en placas (en células SNB19), antes de aumentar de escala, purificación en colchón de sacarosa y resuspensión en PBS que contenía glucosa 15 %.

5 Análisis filogenético: relaciones filogenéticas entre rhabdovirus basadas en un alineamiento muscular de secuencias de aminoácidos de proteína L, y usando la cepa Edmonston de paramixovirus de sarampión como el grupo externo. El árbol se generó por el método de unión de vecinos y se estimaron los valores de bootstrap (indicados para el nodo de cada rama) usando 1000 réplicas de árbol. Las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias genéticas. La barra de escala corresponde a sustituciones por sitio de aminoácido.

10 Inmunotransferencia: las células se lisaron (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 1 %; SDS 1 %) y se cuantificó la proteína usando el ensayo de Lowry (Bio-Rad). Se prepararon lisados celulares totales en tampón de muestra SDS, y se separaron 5-50 µg de proteína total por SDS-PAGE en geles Bis-Tris (que variaron de 8-15 %) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF. Las membranas se exploraron con anticuerpos primarios diluidos en leche desnatada en polvo 5 % (SMP) o Albúmina de Suero Bovino (BSA) 5 % durante una noche a 4 °C, seguido de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano rusticano diluidos en SMP 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: de conejo anti PARP (Cell Signaling, 9542); de ratón anti caspasa 3 (Cell Signaling, 9668); de ratón anti caspasa 8 (Enzo Life Sciences, 12F5); de conejo anti caspasa 9 (Cell Signaling, 9502); de conejo anti BID (Cell Signaling, 2002); de ratón anti GAPDH (R & D Systems). Se generó un anticuerpo policlonal anti FMT en conejos (Capralogics Inc.) usando virus FMT inactivado por UV, purificado. Se visualizaron bandas proteicas usando Sistema de Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology).

25 Agotamiento de linfocitos T CD8+: se implantaron de forma estereotáctica en los cerebros de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad 2e5 células CT2A que expresan luciferasa de luciérnaga (CT2Afluc). Los ratones se trataron con 2e7 UFP de virus Farmington en el sitio de implantación del tumor 7 días después. Para estudios de agotamiento de linfocitos T CD8+, se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) 200 µg de anticuerpo anti CD8 de ratón (clon 2.43) un día antes del tratamiento del virus y 100 µg el día del tratamiento. Se proporcionó una dosis de mantenimiento de 100 µg cada 3 días durante las siguientes 2 semanas.

30 Estadística: para representaciones de Kaplan Meier, se compararon las representaciones de supervivencia usando análisis de rangos Logarítmicos Mantel-Cox (Graphpad Prism).

Ejemplos

35 Ejemplo 1: el virus Farmington no es un vesiculovirus

Se determinó la secuencia genómica de longitud completa para FMT. La secuencia del polinucleótido de ADN complementario (ADNc) producido por FMT se muestra en SEQ ID NO: 1. El polinucleótido de ARN de FMT se muestra en SEQ ID NO: 2. Se identificaron cinco fases abiertas de lectura posibles en la secuencia genómica. Pueden estar presentes ORF adicionales en el virus que aún no se han identificado. Las secuencias de las proteínas correspondientes se muestran en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 y 7, y las secuencias de ADN codificante se muestran en SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 y 12, respectivamente. Se realizó análisis filogenético de la secuencia genómica de longitud completa alineando la posible secuencia de aminoácidos de la proteína L de FMT con las secuencias de proteína L de miembros representativos de los 6 géneros de Rhabdoviridae (Figura 1). El alineamiento demostró que FMT no parecía pertenecer al presente esquema de 6 géneros de la familia Rhabdoviridae. El virus FMT parece ser más divergente de los rhabdovirus conocidos en la actualidad. Aunque se detectó algo de homología de secuencia (~50 % de identidad) entre un segmento corto de la proteína L de FMT y virus amarillo de necrosis de la lechuga, no se pudo detectar ninguna homología de las 4 fases abiertas de lectura (ORF) posibles de FMT restantes (N, P, G, M) con cualquier secuencia en la base de datos del NCBI. Esto sugiere que FMT, que se clasificó originalmente de forma incorrecta como un vesiculovirus (Tesh *et al.*, 2002), puede de hecho constituir el miembro tipo de un nuevo género dentro de la familia Rhabdoviridae (Figura 1; y véase Tabla 2 y archivo del listado de secuencias adjunto).

Tabla 2. Descripción de secuencias

SEQ ID NO. 1	Rhabdovirus Farmington - ADN	ADNc producido por el rhabdovirus FMT
SEQ ID NO. 2	Rhabdovirus Farmington - ARN	
SEQ ID NO. 3	Rhabdovirus Farmington ORF 1	El promotor está en la posición 134 a 149 y la secuencia codificante está en las posiciones 206 a 1444 de SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO. 4	Rhabdovirus Farmington ORF 2	El promotor está en la posición 1562 a 1578 y la secuencia codificante está en las posiciones 1640 a 2590 de SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO. 5	Rhabdovirus Farmington ORF 3	El promotor está en la posición 2799 a 2813 y la secuencia codificante está en las posiciones 2894 a 3340 de SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO. 6	Rhabdovirus Farmington ORF 4	El promotor está en la posición 3457 a 3469 y la secuencia codificante está en las posiciones 3603 a 5717 de SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO. 7	Rhabdovirus Farmington ORF 5	El promotor está en la posición 5766 a 5780 y la secuencia codificante está en las posiciones 5832 a 12221 de SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 3 está codificada por SEQ ID NO: 8 (es decir la secuencia codificante de las posiciones 206 a 1444 de SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 4 está codificada por SEQ ID NO: 9 (es decir la secuencia codificante de las posiciones 1640 a 2590 de SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 5 está codificada por SEQ ID NO: 10 (es decir, la secuencia codificante de las posiciones 2894 a 3340 de SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 6 está codificada por SEQ ID NO: 11 (es decir la secuencia codificante de las posiciones 3603 a 5717 de SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 7 está codificada por SEQ ID NO: 12 (es decir la secuencia codificante de las posiciones 5832 a 12221 de SEQ ID NO: 1).

La Figura 1 muestra A) Esquema de donde se aisló por primera vez FMT en 1969. B) El Alineamiento de Blastos de Aminoácidos de 5 ORF de FMF no revela ninguna homología de secuencia con ninguna otra secuencia en la base de datos excepto por la proteína L que es ~45 % similar al rhabdovirus vegetal: virus amarillo necrótico de Lechuga (LNYV). C) Gel de SDS PAGE teñido con Coomassie de virus FMT que muestra 4 de las 5 proteínas de ORF de FMT predichas. Estas bandas se escindieron del gel y su identidad se confirmó mediante secuenciación de proteínas por espectrometría de masas en tándem. D) Árbol filogenético derivado de las secuencias de aminoácidos de los genes de polimerasa de diversos rhabdovirus. Se incluyó el paramixovirus de sarampión como un control no familiar. Todos los rhabdovirus oncolíticos previos se han identificado en el género vesiculovirus (VSV, Maraba). Inesperadamente, parece que el virus Farmington se agrupa con los citorhabdovirus e infectan plantas. E) Se ha construido un sistema recombinante para la plataforma de FMT que permite un control completo de la composición genética del virus. Se muestra aquí la generación de una cepa de FMT que expresa GFP completamente replicativa como un ejemplo. F) Microfotografía electrónica de virión en forma de bala de FMT que mide 55 nm x 150 nm (adaptado de Tesh *et al.* Emerging Infect. Dis. 2002).

Ejemplo 2: el virus Farmington no demuestra neurotoxicidad

El FMT demostró atenuación profunda en células no transformadas *in vitro*. Para determinar si la atenuación observada *in vitro* se traduce a seguridad *in vivo*, se inyectaron de forma estereotáctica en el cuerpo estriado derecho del cerebro dosis crecientes de rhabdovirus y se supervisó con respecto a señales de neurotoxicidad (incluyendo pérdida de peso, piloerección, parálisis de las extremidades posteriores, morbilidad y mortalidad). FMT tuvo una DL_{50} de aproximadamente 1×10^9 en contraste con otros rhabdovirus que presentaban DL_{50} aproximadamente 10^2 . (Figura 2A). Se determinó que la dosis tolerada máxima (DTM) era la mayor dosis que no daba como resultado morbilidad duradera (Figura 2A). Para FMT la DTM era aproximadamente $1 \times 10^{7.5}$ ufp mientras que para los otros rhabdovirus la DL_{50} se produjo a una dosis tan baja de virus que fue imposible determinar la DTM. Estos animales presentaron señales clínicas de una infección del SNC con pérdida de peso rápida y progresiva, parálisis de las extremidades posteriores y tuvieron títulos significativos de virus en su cerebro justo antes de su muerte (datos no mostrados).

Aunque no se descubrió ninguna neurotoxicidad aguda a partir del tratamiento IC con FMT, se deseó evaluar la función cognitiva y motora de los ratones varios días después de la infección por virus. Por lo tanto, se evaluó la función motora antes y después del tratamiento con estos virus FMT de tipo silvestre usando un aparato rotorod (Figura 2B). Específicamente, se midió el tiempo que tardaban estos animales en caer de una varilla que aceleraba lentamente. Se mostró que no hubo ninguna diferencia significativa en el tiempo hasta la caída entre los animales infectados por simulación o animales infectados por virus, 1 semana antes y 1 semana después de la inyección (Figura 2B).

Además de la toxicidad intracraneal, se evaluó la toxicidad de FMT cuando se administró por vía intravenosa (IV) en ratones inmunocompetentes con dosis crecientes de virus (Figura 2C). FMT se tolera bien IV y nunca alcanza una DL_{50} incluso a la mayor dosis de 3×10^9 ufp que es comparable a una versión atenuada de Maraba que describieron los inventores en Brun, J. *et al.* Identification of Genetically Modified Maraba Virus as an Oncolytic Rhabdovirus. MolTher 18, 1440 (2010). Los animales con dosificación IV de FMT a más de 3×10^8 ufp presentaron pérdida de peso transitoria y piloerección moderada, que se resolvió 5-7 días después del tratamiento (datos no mostrados). No se observó ningún título detectable de homogeneizados cerebrales tomados de animales tratados con FMT 3 meses después del tratamiento IV (Figura 2D). Además, después de la administración de altas dosis de FMT (1×10^7 ufp)

en el cerebro, no se descubrió ninguna señal de muerte celular y respuestas inflamatorias comparables a las de los ratones de control a los que se inyectó solución salina (Figura 2E). Esto difirió drásticamente de animales a los que se inyectó VSV, que presentaron un aumento sorprendente en células inflamatorias, núcleos condensados y una morfología perforada. Debido a su falta de neurotoxicidad y fuerte capacidad de destrucción de tumores del SNC, se eligió continuar con FMT como una plataforma para desarrollar un nuevo oncolítico contra GBM.

La Figura 2 muestra el perfil de seguridad de FMT A) se inyectaron a grupos de 5 ratones Balb/C por vía esterotáctica en el cuerpo estriado derecho del cerebro dosis crecientes de rhabdovirus como se indica y se supervisaron con respecto a señales de malestar incluyendo pérdida de peso, piloerección, parálisis de las extremidades posteriores, morbilidad y mortalidad. Se determinó que la dosis tolerable máxima (DTM) era la dosis más alta que no daba como resultado morbilidad duradera como se midió por comportamiento y peso. Se determinó la DL_{50} usando el método de Spearman Karber. FMT es único entre los rhabdovirus como un virus no neurotóxico. B) Para detectar cualquier deficiencia cognitiva en el cuerpo estriado, se evaluó la función motora por aparato rotorot que mide el tiempo hasta la caída de una varilla en aceleración. La función motora es indistinguible de los controles después de inyección intracerebral de FMT. C) Se inyectó a grupos de 3-5 ratones Balb/C una vez por vía intravenosa en incrementos semilogarítmicos virus que variaba de 3×10^6 ufp a 3×10^9 ufp. Los animales se supervisaron con respecto a señales de malestar incluyendo pérdida de peso, morbilidad, piloerección, parálisis de las extremidades posteriores y dificultad respiratoria. FMT muestra una DTM muy alta de 1×10^9 ufp cuando se suministra por vía sistémica. D) Los animales sacrificados 3 meses después de la inoculación intracerebral no demuestran ningún virus viable en los homogeneizados cerebrales. El límite de detección es 101. E) Se inocularon ratones Balb/C por vía intracerebral con los virus indicados (1×10^7 ufp) y se sacrificaron 2 días después del tratamiento. No es visible ninguna inflamación o es visible poca inflamación y no es detectable ninguna pérdida celular después de tratamiento con FMT. Esto se diferencia de VSV que muestra una pérdida neuronal significativa (espacios vacíos, inserto).

Ejemplo 3: el virus Farmington destruye de forma fuerte y selectiva células tumorales cerebrales

Los aislados de FMT de tipo silvestre demuestran atenuación en células primarias normales manteniendo al mismo tiempo una fuerte capacidad de destrucción de células de glioma (Figura 3A). Para evaluar la relevancia clínica de los nuevos rhabdovirus oncolíticos de los inventores para tratar el cáncer cerebral, se examinó si FMT podría destruir muestras tumorales recién derivadas de pacientes. Se efectuaron cultivos celulares aislados de 3 pacientes con glioblastoma multiforme primario con FMT y 48 h después, los ensayos de viabilidad demostraron que el virus FMT era fuertemente citotóxico para 2 de 3 explantes tumorales de pacientes (Figura 3A). Para ensayar la capacidad de destrucción de los aislados de FMT se realizaron ensayos de destrucción celular en astrocitos humanos normales (AHN) y 3 líneas celulares tumorales GBM (Figura 3B). Aunque MRB de tipo silvestre fue muy fuerte contra todas las líneas celulares GBM, también fue muy lítico contra ambos astrocitos humanos normales (AHN) primarios. Notablemente, FMT demostró el mayor índice terapéutico, con potencia que rivalizaba MRB en la mayoría de líneas de GBM mientras que permanecía altamente atenuado en líneas celulares primarias NHA y GM38 (Figura 3C). Esto demuestra que el virus FMT es un virus oncolítico fuerte y selectivo cuando se ensaya frente a líneas celulares de cáncer cerebral.

En la Figura 3 se muestra A) Sumario de citotoxicidad *in vitro* de FMT que muestra fuerte actividad contra muestras de pacientes con glioblastoma primario y líneas celulares tumorales cerebrales humanas y de ratón establecidas, permaneciendo al mismo tiempo atenuado contra células normales. B) FMT es un destructor fuerte y selectivo de líneas celulares de glioblastoma. Se ensayó la viabilidad usando ensayo de Alamar blue 72 horas después del tratamiento. Las barras de error representan ETM de 4 repeticiones biológicas. C) Evaluación detallada de la fuerza de FMT contra células tumorales y normales. CE50 (moi = multiplicidad de infección) representa la relación de virus:célula requerida para destruir 50 % de las células cultivadas en un marco temporal de 72 horas como se mide usando un ensayo de viabilidad de Alamar blue.

Ejemplo 4: el virus de Farmington es eficaz en modelos de xenoinjerto y singénicos de glioblastoma

A continuación se intentó determinar la eficacia *in vivo* de los virus candidatos de los inventores en modelos de glioblastoma de ratón. Después de adaptar células de glioma U87MG humanas para capturar imágenes bioluminiscentes, se estableció un modelo de glioma U87MG intracerebral en ratones atímicos y se examinó la eficacia IV e IC de FMT en este modelo (Figura 4A-B). Específicamente, los animales se trataron con una única dosis IC (1×10^5) o IV (5×10^8 ufp) de FMT 14 días después de la implantación. Tres días después del primer tratamiento se observó una reducción significativa en la carga tumoral con una reducción mayor observada el día 7 (Figura 4A). Resulta interesante que las metástasis espinales en este modelo estaban completamente eliminadas en todos los animales portadores de tumores. Por el contrario, los animales tratados con virus inactivado por UV tuvieron un aumento significativo en la carga tumoral al día 7 en cuyo momento comenzaron a mostrar síntomas neurológicos de sus tumores cerebrales (Figura 4B). Todos los animales tratados IV respondieron al tratamiento con 4 de 11 curados de forma duradera y que sobrevivieron más de 100 días después del tratamiento. La mayoría de animales tratados IC respondieron al tratamiento (10 de 16) con un aumento significativo (~ 2 veces) del tiempo hasta la muerte. Además también se usó microscopía fluorescente para visualizar explantes tumorales de animales infectados por simulación y animales curados de forma duradera. Aunque se detectó un tumor de glioma que

expresaba GFP fuertemente en animales infectados por simulación, hubo una clara ausencia de señal de GFP en animales tratados con FMT (Figura 4C). Para complementar los estudios de los inventores de la eficacia viral en animales inmunocomprometidos, se ensayó FMT en un modelo de glioma singénico CT-2A de ratón. A diferencia de los modelos de xenoinjertos en los que los gliomas humanos crecen de forma expansiva, los gliomas de CT-2A son infiltrativos de forma similar a lo que se observa clínicamente. Se estableció el modelo de glioma de CT-2A inyectando de forma estereotáctica 2×10^5 células en el cuerpo estriado (lóbulo frontal derecho) de ratones C57BL/6. Ya que los tratamientos comienzan típicamente en pacientes humanos después de presentar síntomas clínicos de GBM, se buscó examinar el efecto de FMT exactamente en el momento en que los animales muestran síntomas externos. En el CT-2A los animales comienzan a mostrar síntomas 15-20 días después de la implantación. Estos síntomas incluyen presión intracraneal aumentada, letargia, función motora, piloerección y postura encorvada. En consecuencia, 19 días después de la implantación los animales C57BL/6 se trataron con FMT IV (5×10^8 ufp tres veces por semana durante 2 semanas) o con una única dosis IC de FMT (2×10^7 ufp). La mayoría de los animales respondieron a ambos regímenes de tratamiento, y se obtuvieron curas duraderas en 3 de 11 animales tratados IC y 2 de 10 animales tratados IV en este modelo de exposición de GBM avanzado (Figura 4D). Por lo tanto el virus FMT demuestra eficacia en modelos preclínicos de cáncer cerebral.

La Figura 4 muestra la eficacia *in vivo* de FMT en modelos preclínicos de glioblastoma A) Se implantaron de forma estereotáctica células de glioblastoma humano U87MG adaptado a bioluminiscencia ($1e6$) en el cuerpo estriado derecho de ratones desnudos CD-1. Después de 2 semanas los animales se trataron con una única dosis de FMT por vía intravenosa (IV- 5×10^8 ufp) o por vía intracraneal (IC- 1×10^5 ufp) y se supervisaron por captura de imágenes de bioluminiscencia IVIS. Los tumores diseminados en todos los ratones tratados con FMT retroceden rápidamente en un periodo de 3-7 días y se hacen indetectables en la médula espinal. B) Representación de supervivencia de Kaplan Meir de animales tratados con una única dosis IC (1×10^5 ufp) que da como resultado una duplicación del tiempo medio hasta la muerte (ensayo de rangos logarítmicos $p = 0,0001$) o IV (5×10^8 ufp) dando como resultado curas duraderas en el 40 % de los animales (Ensayo de rangos logarítmicos $p = 0,0001$). C) Microfotografía de fluorescencia de un cerebro de ratón infectado por simulación con un tumor U87MG marcado con GFP ortotópico (2 paneles superiores) frente a un cerebro tratado con FMT (2 paneles inferiores). El tumor que expresa GFP es claramente visible en secciones sagitales de ratones no tratados, mientras que el tratamiento con FMT no da como resultado ninguna señal tumoral de GFP detectable, lo que confirma la regresión tumoral. D) Modelo de tumor de glioblastoma de ratón singénico usando la línea celular CT2A. De nuevo aquí se permitió que los tumores se establecieran hasta el punto en que los ratones comenzaron a morir por su carga tumoral. El tratamiento tanto IC (una dosis 2×10^7 ufp) como IV (6 dosis 5×10^8) duplicaron el tiempo medio hasta la muerte y dieron como resultado > 20 % de curas duraderas.

Ejemplo 5: el virus Farmington induce inmunidad antitumoral

Cada vez hay más pruebas que demuestran que el efecto oncolítico de muchos virus, incluyendo rhabdovirus oncolíticos, se debe en parte a la inducción de la inmunidad antitumoral. Para explorar la posibilidad de que el virus FMT induzca múltiples mecanismos para destrucción tumoral *in vivo*, se planteó si tratar ratones portadores de tumores inmunocompetentes con virus FMT induce inmunidad antitumoral. Para comenzar, se realizó un experimento de "reexposición", en el que se inyectó a ratones C57/BL6 que previamente albergaban tumores CT-2A que se habían tratado con éxito infusiones de virus FMT IC una segunda vez con células CT-2A directamente en el cerebro. En estos experimentos, los ratones previamente curados rechazaron uniformemente las células (Figura 5A), lo que demuestra que habían adquirido inmunidad de larga duración frente a antígeno o antígenos de CT-2A. A continuación, se examinó el papel de linfocitos T citotóxicos (CTL) en la respuesta antitumoral inducida por virus FMT. Se inoculó a ratones con células CT-2A en su cerebro, y se retiraron después CTL usando anticuerpos dirigidos hacia CD8 junto con tratamiento de virus FMT. De forma coherente con los datos recientes de otros laboratorios que usaron agentes oncolíticos diferentes, estos experimentos mostraron que el virus FMT inducía respuestas completas solamente cuando estaban presentes CTL (Figura 5B). Por lo tanto, además de lisar directamente células MG, estos datos demuestran que el virus FMT induce una respuesta inmunitaria anti MG mediada por CTL fuerte y de larga duración en ratones inmunocompetentes.

En la Figura 5A, se implantaron en ratones C57/B6 células de glioma murino CT2A en el cuerpo estriado (3×10^5 células). Los ratones se trataron con una única dosis de FMT (2×10^7 ufp) y se curaron posteriormente de su tumor inicial. Después de 6 meses, estos ratones se expusieron a células CT2A implantadas en el cuerpo estriado. Se implantaron en ratones sin tratamiento previo células CT2A como control. La captura de imágenes bioluminiscentes para supervisar el crecimiento tumoral de CT2A mostró que ratones que habían curado previamente de los tumores rechazaron completamente el crecimiento tumoral CT2A posterior, mientras que los ratones sin tratamiento previo desarrollaron tumores con la cinética esperada. En la figura 5B) se implantaron en ratones C57/B6 células de glioma murino CT2A en el cuerpo estriado (3×10^5 células) y se permitió que desarrollaran tumores durante 14 días. Un grupo de ratones recibió inyecciones de suero policlonal anti CD8 para retirar linfocitos T CD8+ o suero preinmune coincidente como control. Ambos grupos se trataron con una única dosis intracraneal de FMT (2×10^7 ufp) para inducir regresiones tumorales. Todos los ratones respondieron con regresión tumoral como se midió usando captura de imágenes tumorales bioluminiscente (no mostrado), pero los ratones que estaban desprovistos de sus linfocitos T CD8+ volvieron a desarrollar con el tiempo tumores y fracasó la terapia

Ejemplo 6: el virus Farmington infecta de forma productiva células tumorales y normales

Sin excepción, el índice terapéutico asociado con virus oncolíticos existentes se debe a infección y/o productividad diferencial en células tumorales frente a normales. En el caso de rhabdovirus, las cepas oncolíticas actuales pueden “detectar” defectos específicos de cáncer en señalización de IFN de tipo I, que los hace selectivamente productivos en células transformadas. Desafortunadamente, los rhabdovirus oncolíticos actuales son altamente neurotóxicos cuando se suministran de forma local-regional en el SNC. Dado que el virus FMT es seguro cuando se infunde IC y es genéticamente muy distinto de los agentes existentes, se sospecha que su mecanismo para destrucción específica de tumor debe ser distinto de la productividad aumentada secundaria a defectos del IFN en células tumorales. Para comenzar a evaluar esta hipótesis, se infectaron células SNB19 y AHN con virus rec-FMT-GFP y se evaluó la expresión de GFP y la producción de proteína vírica a lo largo del tiempo. La microscopía de fluorescencia y los análisis de inmunotransferencia demostraron claramente que el virus FMT no distingue el tumor de células normales mediante infectividad diferencial o producción de proteína vírica (Figura 6A-B). Específicamente, la expresión de proteína tanto GFP como FMT se hizo fácilmente detectable 6,5-16 horas después de la infección y continuó expresándose fuertemente 72 horas después, independientemente del estado transformado de la línea celular infectada. En paralelo, se realizó evaluación de crecimiento de una etapa de virus FMT en diversas líneas celulares tumorales y normales para examinar la productividad. Estos experimentos mostraron que las partículas de virus FMT infecciosas se producen rápidamente (en un periodo de 6,5 horas) y hasta altos títulos ($\sim 10^8$ ufp) en líneas celulares tanto tumorales como normales (Figura 6B). Colectivamente, estos datos demuestran que, en claro contraste con la serie VSV $\Delta 51$ y Maraba MG1 de rhabdovirus oncolíticos, el virus FMT es igualmente productivo en células normales en comparación con tumorales.

Se investigó por lo tanto la interacción entre virus FMT y la respuesta de interferón de tipo I. Se añadió virus rec-FMT o Maraba- $\Delta 51$ que expresaba GFP a baja *moi* a una monocapa celular GM38, y se midió el tamaño de focos infecciosos y placas. Como se esperaba, la infección por Maraba- $\Delta 51$ no infectó ni destruyó células GM38 a no ser que la respuesta inmunitaria innata estuviera bloqueada a priori por tratamiento con la proteína B18R inhibidora de interferón de tipo I derivada de virus vaccinia (W-B18R, Figura 6C-D). Por el contrario, el virus FMT formó focos infecciosos de tamaño moderado en las células GM38, pero no las destruyó, y no se vio afectado por el pretratamiento por B18R. Además, a diferencia de Maraba- $\Delta 51$, el virus FMT bloqueó completamente la producción de interferón de tipo I en células PC3 como se midió en un bioensayo de interferón (Figura 6E). Colectivamente, estos resultados indican que, a diferencia del arsenal actual de rhabdovirus oncolíticos modificados por ingeniería genética, el virus FMT bloquea de forma fuerte la respuesta de interferón de tipo I humana y puede infectar productivamente líneas celulares tanto normales como tumorales, lo que apunta hacia un mecanismo selectivo de cáncer nuevo para este agente oncolítico.

En la Figura 6 se muestra A) transferencia de Western que demuestra cinética similar de infección por virus FMT y producción de proteínas tanto en células tumorales cerebrales humanas (SNB19) como en astrocitos humanos normales primarios (NHA). B) Curva de crecimiento de una única etapa que muestra replicación de virus idéntica y productividad de virión de células tumorales (SNB19) y normales (NHA) después de infección con FMT. C) Microscopía de fluorescencia de virus rec-FMT o Maraba- $\Delta 51$ que expresa GFP añadido a una monocapa de células GM38, y se midieron los tamaños de focos infecciosos y placas lo que mostró que la infección por Maraba- $\Delta 51$ no infectaba o destruía células GM38 a no ser que la respuesta inmunitaria innata se bloqueara por tratamiento con la proteína B18R inhibidora de interferón de tipo I derivada de virus vaccinia (W-B18R) mientras que el virus FMT formó focos infecciosos en células GM38 y no se vio afectado por el pretratamiento con B18R. D) Tamaño de focos infecciosos determinado a partir de microscopía de fluorescencia. E) El bioensayo de interferón en células PC3 muestra que a diferencia de Maraba- $\Delta 51$, FMT bloquea la producción de interferón de tipo I.

Ejemplo 7: el virus Farmington induce selectivamente apoptosis en células tumorales

Se usó el sistema de células NT2 que consiste en células de teratocarcinoma NT2 transformadas que pueden inducirse para diferenciarse en neuronas postmitóticas con ácido retanoico. Después de infección con VSV o FMT de tipo silvestre se observó que estos virus infectaban y producían descendencia infecciosa en el mismo grado en formas cancerosas o no cancerosas de las células NT2 (Figura 7A). Sin embargo, aunque estos virus eran fuertemente citotóxicos para células NT2 malignas, FMT no mostró casi toxicidad en células NT2 postmitóticas diferenciadas (Figura 7B). Esto indicó que a diferencia de otros rhabdovirus oncolíticos como VSV, el virus FMT parecía tener un mecanismo único de selectividad tumoral que actuaba en el nivel de citotoxicidad.

Los rhabdovirus destruyen células permisivas por apoptosis, activadas mediante degradación mediada por virus de proteínas solamente BH3 clave, un acontecimiento que en última instancia interacciona con las caspasas intracelulares y extracelulares apicales que inician la cascada de muerte celular irreversible. Para determinar si el virus FMT destruye selectivamente células tumorales mediante inducción diferencial de apoptosis, se evaluó el estado de activación de proteínas clave en la jerarquía apoptótica. Como se esperaba, el marcador de apoptosis sustituto PARP así como el efector corriente abajo caspasa 3 se activaron fuertemente en SNB19 pero no células NHA tratadas con virus FMT (Figura 7C), lo que indica la presencia de apoptosis. Además, las caspasas activadoras 8 y 9 interaccionaron en las células tumorales pero no en las células normales. Los datos del sistema celular NT2 son coherentes con estos datos de apoptosis en las líneas celulares transformadas frente a normales lo que muestra

que la muerte celular inducida por virus FMT no depende de la productividad de la infección vírica dentro de, sino más bien el umbral antiapoptótico de, la célula infectada.

En la Figura 7A, los tipos celulares tanto pre como post diferenciados fueron permisivos para infección por virus VSV WT y FMT wt, produciendo partículas infecciosas en el intervalo de 10^6 - 10^8 . B) muestra que solamente VSV fue citolítico contra la neurona. C) transferencia de Western de varios componentes de la cascada de señalización apoptótica celular después de infección de células tumorales (SNB19) o normales (NHA). FMT parece iniciar la activación (escisión) de Caspasa 8, Caspasa 9, BID y PARP solamente en células tumorales. Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, este es el primer informe de un virus oncolítico cuya actividad no está restringida en el nivel de infectividad, sino en el nivel de inicio selectivo de muerte celular. D) Esquema de cascada de señalización de apoptosis celular. Las proteínas que se escinden durante la activación se representan en naranja y corresponden a las incluidas en la matriz de transferencia de Western de los inventores en el panel C.

En la descripción precedente, para fines de explicación, se exponen numerosos detalles para proporcionar un entendimiento exhaustivo de los ejemplos. Sin embargo, resultará evidente para un experto en la materia que estos detalles específicos no son necesarios. Pueden realizarse cambios equivalentes, modificaciones y variaciones de algunos ejemplos, materiales, composiciones y métodos dentro del alcance de la presente tecnología, con resultados sustancialmente similares.

Se pretende que los ejemplos anteriormente descritos sean solamente ejemplares. Los expertos en la materia pueden efectuar alteraciones, modificaciones y variaciones de las realizaciones particulares sin alejarse del alcance de la invención, definiéndose esta por las reivindicaciones adjuntas a la presente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute Inc. Stojdl, David

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA

<130> PAT 7137W-90

<150> US 61/494.628

<151> 08-06-2011

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 12423

<212> ADN

<213> Rhabdovirus Farmington

<220>

<221> promotor

<222> (134)..(149)

<220>

<221> misc_feature

<222> (206)..(1444)

<223> ORF 1

<220>

<221> promotor

<222> (1562)..(1578)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1640)..(2590)

<223> ORF 2

<220>

<221> promotor

<222> (2799)..(2813)

<220>

	<221> misc_feature
	<222> (2894)..(3340)
	<223> ORF 3
5	<220>
	<221> promotor
	<222> (3457)..(3469)
10	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (3603)..(5717)
	<223> ORF 4
15	<220>
	<221> promotor
	<222> (5766)..(5780)
20	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (5832) .. (12221)
	<223> ORF 5
	<400> 1

ES 2 627 529 T3

ttacgacgca taagctgaga aacataagag actatgttca tagtcaccct gtattcatta	60
ttgactttta tgacctatta ttctgtgaggt catatgtgag gtaatgtcat ctgcttatgc	120
gtttgcttat aagataaaac gatagaccct tcacgggtaa atccttctcc ttgcagttct	180
cgccaagtac ctccaaagtc agacgatggc tcgtccgcta gctgctgccc aacatctcat	240
aaccgagcgt cattcccttc aggcgactct gtcgcgggag tccaagacca gagccgagga	300
attcgtcaaa gatttctacc ttcaagagca gtattctgtc ccgaccatcc cgacggacga	360
cattgcccag tctgggccc tgctgcttca ggccatcctg agcgaggaat acacaaaggg	420
cactgacata gcccgaatcca tcctctggaa cactcccaca cccaacgggc tcctcagaga	480
gcatctagat gccgatgggg gaggtcatt cacagcgtg cccgcgtctg caatcagacc	540
cagcgacgag gcgaatgcat gggccgctcg catctccgac tcagggttgg ggctgtctt	600
ctatgcagcc ctgctgctt acatcatcgg ctggtcagga agaggagaga ctagcccggt	660
gcagcagaac ataggtcaga aatggctgat gaacctgaac gcaatcttcg gcaccacgat	720
caccatcca acaaccgtgc gtctgccaat caacgtcgtc aacaacagcc tcgcagtga	780
gaacggactt gctgccacac tctggctata ctaccgttca tcacctcaga gtcaggacgc	840
gttcttctat gggctcatcc gtccctgttg cagtggatat ctggcctgc tacatcgggt	900
gcaggagatt gatgagatgg agccggactt cctcagtga ccccgatca tccagtgaa	960
tgagggtctac agtgcactca gagccctggg tcaactggga aacgacttca agaccgccga	1020
tgatgagccc atgcaggctt gggcgtgcag gggaatcaac aacggatata tgacatatct	1080
ctcagaaact cctgcgaaga aaggagctgt tgtgcttatg ttgcccatt gcctgtgaa	1140
gggcgactct gaggcctgga acagctaccg cactgcaacc tgggtgatgc cctattgcca	1200
caatgtggcc ctaggagcga tggcaggcta catccaagcc cgccagaaca ccagggcata	1260
tgagggtctca gccagacag gtctcgacgt caacatggcc gcggtcaagg actttgaggg	1320
cagttcaaaa cccaaggctg ctccaatctc gctgatcca cggcccgctg atgtcgcatc	1380
ccgcacctct gagcgcccat ctattcctga ggttgacagc gacgaagagc tcggaggaat	1440
gtaaaccaat aagcttcact gccggtagtt taggcataca cacgcagttc cgttatccat	1500
cacaccgctc cttcttttta tgctgtatt atttcagttg ctaagcttcc tgatttgatt	1560
aacaaaaaac cgtagacctc ctacgtgagg tatagctaga aattggttct atcggttgag	1620
agtctttgta ctattagcca tggaggacta tttgtctagc ttagaggccg cgagagagct	1680
cgtccggacg gagctggagc ccaagcgtaa cctcatagcc agcttagagt ccgacgatcc	1740

cgatccggta atagcgccag cggtaaaacc aaaacatccc aagccatgcc tgagcactaa	1800
agaagaggat catctcccct ctcttcgcct actattcggc gcaaaacgag acacctcggt	1860
gggcgtagag cagactctcc acaagcgtct ctgcgcttgt ctgcacgggt acctgacct	1920
gacgaagaaa gaggccaatg cctttaaggc cgcggtgaa gcagcagcat tagcagtc	1980
ggacattaag atggagcatc agcgccagga tctagaggat ctgaccgctg ctatccctag	2040
gatagaattc aaactcaatg ccctcctgga aaacaacaag gagatagcca aggtgtgtaac	2100
tgctgctaag gagatggagc gggagatgtc gtggggggaa agcgccgcca gctcgctcaa	2160
gtctgtcacc ctagatgagt cgtttagggt ccctgaagag ctttcagagt catttggtcat	2220
ccgatataag gtcagaacct ggaatgagtt caagaaggcg ctggaaacca gcattgtgga	2280
cctgaggcct agccctgttt catttaggga attacggact atgtggctgt ctcttgacac	2340
ctcctttagg ctcatgggt ttgccttcat tcccacatgc gagcgcttg agaccaaagc	2400
caaatgcaag gagacaagga ctctactccc ccttgacagag tcgatcatgc gaagatggga	2460
cctgcgggat ccaacctct tggagaaagc ctgcgtagta atgatgatcc gtgggaatga	2520
gattgcatcg ctgaatcagg taaaagatgt tctcccgacc acaattcgtg ggtggaagat	2580
cgcttattag tcaactgtcc cattagtccc actagacggc atacttccat tccgcccttt	2640
aattcccctg tcagacactc atgctccgaa atcactaacc atccttgtcc accaagcaat	2700
acgcatattc agtagcactg catctcgccc tcccctatc aagccccagc gctgcagatc	2760
ttcaccacat atatacatgc atcaactaca tgtgatttag aaaaaaccag acccttcacg	2820
ggtaatagcc taactcacga acgttcctct cgtttcgtat gataaggcct taagcattgt	2880
cgatacggtc gttatgcgtc ggttcttttt aggagagagc agtgcccctg cgagggactg	2940
ggagtccgag cgacctcccc cctatgctgt tgaggctcct caaagtcacg ggataagagt	3000
caccgggtac ttccagtgc aagagcgctc gaaatccaag aagaccctcc acagcttcgc	3060
cgtaaaactc tgcgacgcaa ttaagccggt tcgagcggat gctcccagct tgaagatagc	3120
aatatggacg gctctagatc tggccttcgt gaaacctccc aatggaactg taacaataga	3180
tgccggcgtg aaagctacac cgctaatcgg gaacaccag tacaccgtag gcgatgaaat	3240
cttcagatg ctagggagaa ggggtggcct gatcgtcatc aggaacttac cccatgatta	3300
tcctcgaacg ttgattgagt togcctctcc cgagccttga gcaccagggc atcggtccgc	3360
ccgccctgtg atctcccgtg gccgggctca gcgatcaagc cggcccgggt cgggggggac	3420
tggtgcaaca caagggcgcg cagtggacgc tgattaacaa aaaaccacct atatagacct	3480
ctcacggtct tagactctgt tgccagctga caaccaacac acaagacatc tctctgattc	3540
agccgacctg atcgattcct cccaccctaa ttctaccaa cgcactctc acaagctcca	3600
ccatgctcag gatccagatc cctccgattg ctatcattct ggtaagtctc ctcacactcg	3660

aactgtccgg	tgcaaggagg	acaaccacac	aaagaatccc	tctccttaat	gattcgtggg	3720
atttgtttctc	gagctatggc	gacattcccc	aagaacttgt	cgtataccag	aactacagcc	3780
acaattcctc	cgagttaccc	cctcctggct	tcgagagatg	gtacataaac	cgaagagtgg	3840
cagacacttc	cataccgtgc	agggggcccct	gtctagtgcc	ctacatcctt	catggcctca	3900
atgacacaac	tgtctctcga	cggggaggag	gatggcgaag	gtccggaatg	aagtacccaa	3960
cccacgctgt	caggctaggc	ccttcaacag	acgacgagag	agttgaggaa	gacatcggct	4020
acgtcaatgt	ctccgcacta	tctctgcacag	ggtcgcccgt	tgagatggcg	ataccaacaa	4080
tccccgactg	caccagtgtc	atccatccac	gatccgaggt	tactgtgccc	gtcaagctcg	4140
atgtcatgag	acgaaatccc	aactaccctc	ccattagagc	gtggtcgtgc	atcggacaga	4200
aaatcaccaa	ccgatgtgat	tgggcactct	tcggcgagaa	cctcatatat	actcaagttg	4260
aagctagctc	tctagcattc	aagcacacaa	gagcctctct	tttgaacgaa	tccaacggga	4320
tagacgctga	aggacgtgca	gttccttata	tctcggggga	tatcgaaccc	gggtactgcc	4380
gaaccctatt	caacacatgg	gtctctagt	agatcgtgtc	atgcacgccc	atcgaacttg	4440
tcttagttga	cctgaaccct	ttgtccccgg	gacatggcgg	atatgctgta	ttgctgccaa	4500
acggagacaa	agtggatgta	cacgacaagc	atgcatggga	tggggacaac	aaaatgtgga	4560
gatgggtgta	cgagaagaaa	gatccctgtg	cgttcgagct	ggtatccagg	gaagtgtgtc	4620
ttttctcact	gagtaggggt	agtagactga	gaggagcaac	ccctcccaa	ggagagctcc	4680
tcacctgccc	gcattcggga	aaggcatttg	acctgaaggg	ggcccgaagg	attacaccca	4740
tttcatgcaa	aatcgacatg	gaatatgact	tgctgtcact	accaaccgga	gtcatcctag	4800
gcctccacct	atcagaactc	gggacctcct	ttggcaacct	ctcaatgagt	cttgaaatgt	4860
atgaacctgc	cacaactctg	acctctgagc	aaatcaactt	ctcgcttaaa	gagctgggaa	4920
gctggaccga	ggctcaactg	aagagcctgt	ctcactcaat	ctgcctctcc	acattctcca	4980
tatgggaact	atcggttggg	atgatcgatc	taaaccttac	cagggcagca	agggccttgc	5040
tccatgatga	taacatactg	gcaacattcg	agaacggtca	cttttccatc	gtcagatgtc	5100
gtccggaaat	agttcaagtc	ccttcgcata	ctcgagcatg	tcacatggat	ctccgccctt	5160
atgacaagca	atcacgggca	tcaaccttgg	tggttcccct	tgacaacagc	actgccctcc	5220
tgggtccccga	caacatcggtg	gttgaaggag	tagaggccag	tctatgcaac	cactccgttg	5280
ccatcacgct	gtcgaagaac	agaactcact	catacagcct	ctatccccag	ggtcgtcctg	5340
tgcttcgaca	gaaagggtgcc	gtggagctcc	cgacgatagg	gcccctccag	ttacatcctg	5400
ccactcgagt	ggacctttat	acactgaaag	agttccagga	ggaccgaata	gcgcgcagtc	5460
gagtcacaga	catcaaggct	gccgttgacg	atctgcgtgc	gaagtggcgt	aaaggcaaat	5520

ttgaggcgga caccacggga gggggacttt ggtcggcgat tgtgggagtc ttcagttctc	5580
tcgggggggtt cttcatgagg cccttgattg ctctcgcggc gatagtgacc tcaatcatca	5640
tcctgtatat ccttctgcgt gtactgtgtg ctgcctcatg ttcgacacac cgaagagtaa	5700
ggcaggactc ttggtaaaga ggactgcgat tgttgagtgg acaaacccta ggcctattcc	5760
gatttagaaa aaaccagacc tctcacgagg tcttttctac tagctgggtt ttcctcattc	5820
tatccagagc catggccttc gaccogaact ggacagagaga aggttatgaa tgggatccgt	5880
caagtgaggg cagaccgacc gatgagaacg aagacgacag aggtcatcgg ccaaaaacga	5940
gacttcgtac attccttgcc cgcacgttaa atagccctat ccgagcccta ttctacacaa	6000
tattcctagg aattcgagcg gtttgggacg ggttcaaaag actcctacct gtgaggaccg	6060
aaaagggtta tgcgaggttt tctgagtgcg tcacatatgg aatgatcggg tgtgatgagt	6120
gtgtaataga cccggtgagg gttgtcattg agctgaccga gatgcagtta ccgattaaag	6180
gcaaaggctc tacgaggttg agagcaatga taactgaaga ccttctcacg gggatgcgca	6240
cagccgtgcc tcagatcaga gtgagatcga agatcctagc agagcgggta gggagagcaa	6300
tcggccgaga gaccttgccg gcaatgatcc atcatgagtg ggcatttggt atggggaaga	6360
ttctcacttt catggcagac aatgtgggta tgaacgctga cacggtcgag ggcgttctat	6420
cactatcaga ggtcacacgg cgatgggata tcggcaactc tgtgtccgca gtgttcaatc	6480
ctgatggcct tactatcaga gtagaaaaca cgggttacat catgaccaga gagactgcct	6540
gcatgatcgg agacattcat gctcaatttg caatccaata cctagctgca tacctagacg	6600
aggtgatcgg cacaaggacg tctctctcac ccgccgaact gacctctctc aaactatggg	6660
gacttaacgt cctgaaactc ctaggacgga acggttatga ggtgatcggc tgcattggagc	6720
ccatagggta cgctgtcctg atgatgggaa gagacaggag tcctgatccc tatgtcaatg	6780
acacctattt aaacagcatc ctctcagaat tcctgtcga ctctgacgct cgagcctgcg	6840
ttgaagccct cttaactatc tatatgagct tcggcacacc ccataaagtc tcggacgcat	6900
tcggcctctt cagaatgttg ggacatccga tgggtgatgg agctgacggg attgaaaaga	6960
tgcgaagggt aagcaagaag gtcaagatcc cagaccagtc tacagcgatc gacctcgggg	7020
ctatcatggc cgaactgttt gtgoggagtt tcgtaaagaa gcacaaaagg tggcccaact	7080
gctccatcaa tctcccgcca cgacaacctc tccaccacgc ccgcctatgt gggtatgtcc	7140
cggctgaaac ccatccccta aacaacactg catcctgggc ggctgtggag ttcaaccagg	7200
aattcgagcc gccgagacag tacaaccttg cagacatcat tgatgacaag tcgtgctctc	7260
ccaacaagca tgagctatat ggtgcttggg tgaagtcaaa aacagctggg tggcaggaac	7320
aaaagaagct catactccga tggttcactg agaccatggg taaaccttcg gagctcctgg	7380
aagagattga tgcacacggc ttccgagaag aggataagtt gattggatta acaccaaaagg	7440

ES 2 627 529 T3

agagagagct gaaattaaca ccaagaatgt tctccttgat gacattcaag ttcagaacct	7500
accaagtccct cactgagagt atggctgcgcg atgagatccct cccgcacttc cccagatca	7560
ccatgaccat gtccaaccac gaactcacia agaggttgat tagcagaacg agacctcaat	7620
ctggaggagg gcgtgatgtt cacatcacgcg tgaacataga tttccagaaa tggaacacaa	7680
acatgagaca cggactggtc aaacatgtct tcgagcgact ggacaacctc tttggcttca	7740
ccaacttaat cagacgaact catgaatact tccaggaggc gaaatactat ctggctgaag	7800
atggaactaa tctgtcgttc gacaggaacg gggagttaat agatggccca tacgtttaca	7860
ccggatcata cggggggaac gaggggttac gacagaagcc ctggacaata gttaccgtgt	7920
gtggaatata caaggtagct agagacctga aaatcaaaca tcagatcacc ggtcaggag	7980
ataatcaggt ggtcaccta atatttcgcg atcgagagtt gccttcagat ccggtggaga	8040
ggagcaagta ctgtagagac aagagcagtc agttcctgac acgtctcagt caatatttcg	8100
ctgaggttg tttgcccgtc aagactgaag agacatggat gtcacacgt ctctatgctt	8160
acggtaacgc catgtttctta gagggagttc cacttaagat gtttctcaag aagataggca	8220
gagctttcgc cctctcgaat gagtttgtcc cgtccctcga ggaagatctg gccagagtct	8280
ggagtgcac cagcgcagcg gtagagcttg acctaacctc ctacgtagga tatgtcctcg	8340
ggtgctgctt gtctgcgcag gcgatcagaa atcacctcat ctactccctt gttctggagg	8400
gccctctgct gggttaaggcc tacgagcgta agttcattaa ctacgacgga ggaacaaagc	8460
ggggggcgat gcccgcccta cgtccaacct ttgagagcct agtcaaaagt atctgctgga	8520
agccaaaggc catcggaggg tggccggtat tgatgttaga agatctcatc atcaaagggt	8580
tccctgatcc ggcgactagc gccctggctc aattgaagtc aatggtgcc aatacctctg	8640
gtatcgaccg ggagatcata ctttctgtc tcaaccttcc cttatcgtcg gtggtatctc	8700
cgtcaatgtt gttaaaggac ccggcggcca tcaacacat cacaaccccg tccgcgggcg	8760
acatcctgca agaggtcgcc agagactatg ttaccgatta cccactcaa aaccgcagc	8820
tcagagcagt ggtcaagaac gtgaagaccg agctagacac attggccagt gacttattca	8880
aatgtgaacc tttctttcct cctttaatga gcgatatctt ctcggcctct ctccggcat	8940
atcaagacag gattgttcgc aagtgtcca cgacttctac aatcaggaga aaagctgccg	9000
agaggggctc cgactctctc ctcaaccgga tgaaaaggaa tgagatcaat aagatgatgt	9060
tacatctttg ggctacctgg ggaaggagcc ctctggccag attagacacc agatgtctca	9120
caacctgcac caagcaatta gcccaacagt atcggaacca gtcttgggga aagcagatcc	9180
atggagtctc agtcggccac cccttagaac tgttcggctc aataaccccc agccatagat	9240
gcctacatga ggaggaccac ggagatttcc tgcaaacctt cgccagcgag catgtgaacc	9300

aagtggacac	cgacatcacc	acaactctgg	ggccgttcta	cccttacata	ggctcggaga	9360
cgcgagaacg	ggcagtcaag	gttcgaaaag	gagtgaatta	cgtagttgag	ccgcttctga	9420
aacccgcagt	tcgactacta	agagccatta	attggttcat	tcccgaggag	tcagatgcgt	9480
cccatttgct	gagcaatcta	ttagcgtctg	ttaccgacat	caatcctcaa	gaccactact	9540
catctaccga	agtagggggg	ggcaacgcog	tccatcgcta	cagctgccga	ctatccgaca	9600
aattgagcag	agtcaacaac	ttatatcagt	tgcatactta	tttatctgtc	acaacagagc	9660
ggttgaccaa	gtacagtcga	ggatcaaaaa	acactgacgc	acacttccag	agcatgatga	9720
tttatgcaca	aagccgtcat	atagacctca	tcttgagtc	tctgcacacc	ggagagatgg	9780
taccgttgga	gtgtcatcat	cacattgagt	gcaatcactg	tatagaggat	atacccgacg	9840
agccaatcac	gggggacccg	gcttggactg	aagtcaagtt	tccttcaagt	cctcaggagc	9900
cctttcttta	catcaggcaa	caagatctgc	cggtaaaga	caaactcgag	cctgtgcctc	9960
gcatgaacat	cgtccgtctt	gcgggattgg	gtccggaggc	gattagttag	ctagcgcact	10020
actttgttgc	attccgagtt	atccggggcg	cagagacgga	tgtcgaccct	aacgatgttc	10080
tctcgtggac	ctggctgagc	cgaattgatc	ctgacaaatt	ggttgagtat	atcgtgcatg	10140
tgttcgcttc	actggaatgg	catcatgtat	taatgtcagg	cgtgagtgtg	agcgtcagag	10200
atgcattctt	taagatgcta	gtgtctaaaa	gaatctcaga	gactccgcta	agttcattct	10260
attatctggc	caacctgttc	gttgaccctc	agactcgoga	agcactaatg	agctctaaat	10320
acgggttcag	cccccccgcc	gagacagtcc	ccaacgcaaa	tgccgcogca	gccgaaataa	10380
gaagatgctg	tgcgaaacagt	gcgcgcgtcg	tcttagaatc	agcccttcac	agccgtgagg	10440
ttgtttggat	gccaggaacg	aacaattatg	gagacgttgt	catctggtct	cattacatta	10500
gattacgggt	cagcgaagtt	aaactagttg	acattacacg	atatcagcag	tggtggagac	10560
agtctgagcg	agaccctac	gatttggtcc	cggacatgca	ggttcttgag	agcgacctag	10620
atacgtctgat	gaaacggata	ccgaggctca	tgcgcaaggc	gagacgtccc	cctcttcagg	10680
taattcgaga	ggacctggat	gtcgcagtca	tcaatgctga	tcacccogct	cactctgtgc	10740
ttcagaacaa	atacaggaaa	ttgattttca	gagagccgaa	gattatcacg	ggagctgtgt	10800
acaagtacct	ctccctaaaa	tcagagttga	cagagttcac	ctcagcaatg	gtgatcggag	10860
acggaactgg	aggtatcacc	gccgccatga	tggccgatgg	gatagatgtg	tggtatcaga	10920
cgtcgtcaa	ctatgaccac	gtgacacaac	agggattatc	cgtacaagcc	ccggcagcat	10980
tggtatcttct	gcgcggggca	ccctctggta	ggctcttgaa	tcogggaaga	ttcgcatcat	11040
ttgggtctga	cctaactgac	cctcgattta	cagcctactt	tgatcaatat	ccccggttca	11100
aggtggacac	tctatggtct	gacgcagagg	gcgacttttg	ggacaagcct	tccaagttga	11160
atcaatactt	tgagaacatc	attgctttga	gacatcgggt	cgtgaagaca	aatggacagc	11220

ES 2 627 529 T3

```

ttgtcgtgaa ggtgtatctg actcaagaca ctgctaccac aattgaagca ttcagaaaga 11280
agctgtcccc atgcgccatc atcgtgtctc tcttctcgac ggaaggctcc acagaatgct 11340
tcgtcctaag caatctcatc gcaccagaca cccctgtcga ccttgagatg gtggagaata 11400
tccctaaact aacatccctt gttccccaga ggacgacagt gaaatgctat tcccgacgag 11460
tagcgtgcat cagtaaaagg tggggacttt tcagatctcc gagcatagcc cttgaagtcc 11520
aaccgttcc tcactacatc acaaagggtca tctcagacaa aggaacacaa ctgagtctca 11580
tggcggtagc tgacacaatg atcaacagtt acaagaaggc tatctcacc cagtggttcg 11640
atctacaccg gcatagggcc gcactgggtt tcgggaggag atccttgcat ctcatctggg 11700
ggatgatcat ctaccaatc gcttaccagc attttgagaa tccggccaag ttgatggatg 11760
tcctggacat gttgaccaat aacatctcag ctttcttate gatatcgctg tcaggatttg 11820
acctgtcatt tagtgtcagt gcagaccgag atgtccggat tgacagcaaa cttgtcagac 11880
tcccgttatt cgaaggatca gacctaaaat tcatgaaaac catcatgtct accctcggat 11940
ctgtgttcaa ccaggctgag ccttttaagg ggatcgccat aaacccttct aaactaatga 12000
ctgtcaagag gacacaggag ttacgttaca acaacctaat ttacactaag gatgccatcc 12060
tattcccaa tgaagcggca aaaaacactg ccccgcttcg agccaacatg gtataccccg 12120
tccggggaga tctattcgcc cctaccgatc gcataccaat catgactcta gtcagcgatg 12180
agacaacacc tcagcactct cctccagagg atgaggcata actgaatcct ccctgaaggc 12240
tcacatgtcc cagcgacgc aagatataac gacaagcaac tcgccctatt aactgtgatt 12300
aataaaaaac cgattattca gttgcttgag ggagtttcaa tccgttcagt gtatgatagg 12360
aagtttctga gatggtggg attagggggc acctagagta tgtttggtcg ttttatgcgt 12420
cgt 12423

```

<210> 2
 <211> 12423
 <212> ARN
 <213> Rhabdovirus Farmington

<400> 2

```

uuacgacgca uaagcugaga aacauaagag acuauguuca uagucacccu guauucauaa 60
uugacuuua ugaccuauua uucgugaggu cauaugugag guaaugucau cugcuuaugc 120
guuugcuuau aagauaaaac gauagacccu ucacggguua auccuucucc uugcaguucu 180
cgccaaguac cuccaaaguc agacgauggc ucguccgcu gcuugcugcg acaucucau 240
aaccgagcgu cauucccuuc aggcgacucu gucgcgggcg uccaagacca gagccgagga 300
auucgucaaa gauuucuacc uucaagagca guauucuguc ccgaccaucc cgacggacga 360
cauugcccag ucuggggcca ugcugcuuca ggccauccug agcgaggaau acacaaaggc 420

```

cacugacaua	gccc aa ucca	uccucuggaa	cacucccaca	cccaacgggc	uccucagaga	480
gcaucuagau	gccgaugggg	gaggcucauu	cacagcgug	cccgcgucug	caaucagacc	540
cagcgacgag	gcgaaugcau	gggccgcucg	caucuccgac	ucaggguugg	ggccugucuu	600
cuaugcagcc	cucgcugcuu	acaucaucgg	cuggucagga	agaggagaga	cuagccgcgu	660
gcagcagaac	auaggucaga	aauggcugau	gaaccugaac	gcaaucuucg	gcaccacgau	720
cacccaacca	acaaccgugc	gucugccaau	caacgucguc	aacaacagcc	ucgcagugag	780
gaacggacuu	gcugccacac	ucuggcuaua	cuaccguuca	ucaccucaga	gucaggacgc	840
guucuucua	gggcucaucc	guccugugug	caguggauau	cucggccugc	uacaucgggu	900
gcaggagauu	gaugagaugg	agccggacuu	ccucagugac	ccccggauca	uccaggugaa	960
ugaggucua	agugcacuca	gagccuggu	ucaacuggga	aacgacuua	agaccgccga	1020
ugaugagccc	augcaggucu	gggcgugcag	gggaaucaac	aacggauauc	ugacauaucu	1080
cucagaaacu	ccugcgaaga	aaggagcugu	ugugcuuaug	uuugcccaau	gcaugcugaa	1140
gggcgacucu	gaggccugga	acagcuaccg	cacugcaacc	ugggugaugc	ccuauugcga	1200
caauguggcc	cuaggagcga	uggcaggcua	cauccaagcc	cgcagaca	ccagggcava	1260
ugaggucua	gcccagacag	gucucgacgu	caacauggcc	gcggucaagg	acuuugaggc	1320
caguucaaaa	ccaaggcug	cuccaauuc	gcugaucca	cgcgcgcug	augucgcauc	1380
ccgcaccucu	gagcgcccau	cuauuccuga	gguugacagc	gacgaagagc	ucggaggaau	1440
guaaaccaau	aagcuucacu	gccgguagu	uaggcauaca	cacgcaguuc	cguuauccau	1500
cacacccguc	ccuucuuua	ugcugcuauu	auuucaguug	cuaagcuucc	ugauuugauu	1560
aacaaaaaac	cguagaccuc	cuacgugagg	uauagcuaga	aauggguucu	aucggguagag	1620
agucuuugua	cuauuagcca	uggaggacua	uuugucuagc	uuaggggccg	cagagagagcu	1680
cguccggacg	gagcuggagc	ccaagcguaa	ccucauagcc	agcuuagagu	ccgacgaucc	1740
cgauccggua	auagcgccag	cgguaaaacc	aaaacauccc	aagccaugcc	ugagcacuaa	1800
agaagaggau	caucuccccu	cucuucgccu	acuauucggc	gcaaaacgag	acaccucggu	1860
gggcguagag	cagacucucc	acaagcgucu	cugcgcuugu	cucgacgguu	accugaccu	1920
gacgaagaaa	gaggccaau	ccuuuaaggc	cgcggcugaa	gcagcagcau	uagcagucau	1980
ggacauuaag	auggagcauc	agcgccagga	ucuagaggau	cugaccgcug	cuauccuag	2040
gauagaauc	aaacucaaug	ccauccugga	aaacaacaag	gagauagcca	aggcuguaac	2100
ugcugcuuag	gagauggagc	gggagauguc	guggggggaa	agcgccgcca	gcucgcucua	2160
gucugucacc	cuagaugagu	cguuuagggg	cccuagaagag	cuuucagagu	cauuuggcau	2220
ccgauuaaag	gucagaaccu	ggaugaguu	caagaaggcg	cuggaaacca	gcauugugga	2280

ccugaggccu	agcccuguuu	cauuuagggg	auuacggacu	auguggcugu	cucuugacac	2340
cuccuuuagg	cucauugggu	uugccuucan	ucccacaugc	gagcgccugg	agaccaaagc	2400
caaaugcaag	gagacaagga	cucuacucac	ccuugcagag	ucgaucaugc	gaagauggga	2460
ccugcgggau	ccaaccaucu	uggagaaagc	cugcguaqua	augaugaucc	gugggaauga	2520
gauugcaucg	cugaaucagg	uaaaagaugu	ucucccgacc	acaauucgug	gguggaagau	2580
cgcuuauuag	ucacugcucc	cauuaguccc	acuagacggc	auacuuccau	uccgcccuuu	2640
aauccccug	ucagacacuc	augcuccgaa	aucacuaacc	auccuugucc	accaagcaau	2700
acgcuaauuc	aguagcacug	caucucgccc	ucccccuau	aagccccagc	gcugcagauc	2760
uucaccacau	auauacaugc	aucaacuaca	ugugauuuag	aaaaaaccag	acccuucacg	2820
gguaauagcc	uaacucacga	acguuccucu	cguuucguau	gauaaggccu	uaagcauugu	2880
cgauacgguc	guuauugcuc	gguuuuuuu	aggagagagc	agugccccug	cgagggacug	2940
ggaguccgag	cgaccucucc	ccuauugcug	ugaggucccu	caaagucacg	ggauaagagu	3000
caccggguac	uuccagugca	acgagcgucc	gaaauccaag	aagaccuccc	acagcuucgc	3060
cguaaaacuc	ugcgacgcaa	uuuagccggg	ucgagcggau	gcucccagcu	ugaagauagc	3120
aaauaggacg	gcucuagauc	uggccuucgu	gaaaccuccc	aauggaacug	uaacaauaga	3180
ugcggcggug	aaagcuacac	cgcuaaucgg	gaacacccag	uacaccguag	gcgaugaaau	3240
cuuccagaug	cuagggagaa	gggguggccu	gaucgucauc	aggaacuua	cccaugauua	3300
uccucgaacg	uugauugagu	ucgccucucc	cgagccuuga	gcaccagggc	aucgguccgc	3360
ccgcccugug	aucucccgua	gccgggcuca	gcgaucaagc	cgggccgggu	cgggggggac	3420
uggugcaaca	caaggggagg	caguggacgc	ugauuaacaa	aaaaccaccu	auauagaccc	3480
cucacggucu	uagacucugu	ugccagcuga	caaccaacac	acaagacauc	ucucugauuc	3540
agccgacccg	aucgauuccu	ccccacccaa	uuccuaccaa	cgcacuccuc	acaagcucca	3600
ccaugcucag	gauccagauc	ccuccgauug	cuaucauucu	gguaagucuc	cucacacucg	3660
accuguccgg	ugcaaggagg	acaaccacac	aaagaauccc	ucuccuuauu	gauucguggg	3720
auuuguucuc	gagcuauagg	gacauucccg	aagaacuugu	cguauaccag	aacuacagcc	3780
acaauuccuc	cgaguuaacc	ccuccuggcu	ucgagagaug	guacauaaac	cgaagagugg	3840
cagacacuuc	cauaccgugc	aggggccccu	gucuagugcc	cuacaucuuu	cauggccuca	3900
augacacaac	ugucucucga	cggggaggag	gauggcgaag	guccggaaug	aaguacccaa	3960
cccacgcugu	caggcuaggc	ccuucacacg	acgacgagag	aguugaggaa	gacaucggcu	4020
acgucaauug	cuccgcacua	uccugcacag	ggucgcccgu	ugagauggcg	auaccaacaa	4080
uccccgacug	caccagugcu	auccauccac	gauccgaggu	uacugugccc	gucaagcucg	4140
augucaugag	acgaaauccc	aacuaccuc	ccauuagagc	guggucgugc	aucggacaga	4200

aaaucaccaa	ccgaugugau	ugggcacucu	ucggcgagaa	ccucauauau	acucaaguug	4260
aagcuagcuc	ucuagcauuc	aagcacacaa	gagccucucu	uuugaacgaa	uccaacggga	4320
uagacgcuga	aggacgugca	guucccuaua	uccucgggga	uaucgaaccc	ggguacugcc	4380
gaacccuauu	caacacaugg	gucucuagug	agaucguguc	augcacgccc	aucgaacuug	4440
uccuaguuga	ccugaacccu	uugucccccg	gacauggcg	auaugcugua	uugcugccaa	4500
acggagacaa	aguggaugua	cacgacaagc	augcauggga	uggggacaac	aaaauuggga	4560
gaugggugua	cgagaagaaa	gaucccugug	cguucgagcu	gguauccagg	gaaguguguc	4620
uuuucucacu	gaguaggggu	aguagacuga	gaggagcaac	cccuccccaa	ggagagcucc	4680
ucaccugccc	gcuuucggga	aaggcauuug	accugaaggg	ggcccgaagg	auuacaccca	4740
uuuauugcaa	aaucgacaug	gaauaugacu	ugcugucacu	accaaccgga	gucauccuag	4800
gccuccaccu	aucagaacuc	gggaccuccu	uuggcaaccu	cucaaugagu	cuugaaaugu	4860
augaaccugc	cacaacucug	acccugagc	aaaucaacuu	cucgcuuaaa	gagcugggaa	4920
gcuggaccga	ggcucaacug	aagagccugu	cucacucaau	cugccucucc	acauucucca	4980
uaugggaacu	aucgguuggg	augaucgauc	uaaaccuac	cagggcagca	agggccuugc	5040
uccaugauga	uaacauacug	gcaacauucg	agaacgguca	cuuuuccauc	gucagauguc	5100
gucgggaaau	aguucaaguc	ccuucgcauc	cucgagcaug	ucacauggau	cuccgcccuu	5160
augacaagca	aucacgggca	ucaaccucgg	ugguuccccu	ugacaacagc	acugcccucc	5220
uggucccccga	caacaucgug	guugaaggag	uagaggccag	ucuauagcaac	cacuccguug	5280
ccaucacgcu	gucgaagaac	agaacucacu	cauacagccu	cuauccccag	ggucguccug	5340
ugcuucgaca	gaaaggugcc	guggagcucc	cgacgauagg	gccccuccag	uuadauccug	5400
ccacucgagu	ggaccuuuau	acacugaaa	aguuccagga	ggaccgaaua	gcgcgcaguc	5460
gagucacaga	caucaaggcu	gccguugacg	aucugcgugc	gaaguggcg	aaaggcaauu	5520
uugaggcgga	caccacggga	gggggacuuu	ggucggcgau	ugugggaguc	uucaguucuc	5580
ucgggggggu	cuucaugagg	cccuugauug	cucucgcggc	gauagugacc	ucaaucauca	5640
uccuguaauu	ccuucugcg	guacugugug	cugccucaug	uucgacacac	cgaagaguaa	5700
ggcaggacuc	uugguaaa	ggacugcgau	uguugagugg	acaaaccua	ggccuauucc	5760
gauuuagaaa	aaaccagacc	ucucacgagg	ucuuuucua	uagcuggguu	uuccucauuc	5820
uauccagagc	cauggccuuc	gaccggaacu	ggcagagaga	agguuaugaa	ugggauccgu	5880
caagugaggg	cagaccgacc	gaugagaacg	aagacgacag	aggucaucgg	ccaaaaacga	5940
gacuucguac	auuccuugcc	cgcacguuaa	auagcccuau	ccgagccua	uucuacacaa	6000
uauuccuagg	aaucgagcg	guuugggacg	gguucaaaa	acuccuaccu	gugaggaccg	6060

aaaagggguua	ugcgagguuu	ucugagugcg	ucacauaugg	augaucgga	ugugaugagu	6120
guguaauaga	cccggugagg	guugucauug	agcugaccga	gaugcaguua	ccgauuaaag	6180
gcaaagggcuc	uacgagguug	agagcaauga	uaacugaaga	ccuucucacg	gggaugcgca	6240
cagccgugcc	ucagaucaga	gugagaucga	agaucuuagc	agagcgguua	gggagagcaa	6300
ucggccgaga	gaccuugccg	gcaaugauc	aucaugagug	ggcauuugug	auggggaaga	6360
uucucacuuu	cauggcagac	aaugugggua	ugaacgcuga	cacgguccgag	ggcguucua	6420
cacuaucaga	ggucacacgg	cgaugggaa	ucggcaacuc	uguguccgca	guguucaauc	6480
cugauggccu	uacuaucaga	guagaaaaca	cggguuacau	caugaccaga	gagacugccu	6540
gcaugaucgg	agacauucan	gcucaauuug	caauccaaua	ccuagcugca	uaccuagacg	6600
aggugaucgg	cacaaggacg	ucucucucac	ccgccgaacu	gaccucucuc	aaacuauggg	6660
gacuuacgu	ccugaaacuc	cuaggacgga	acgguuaua	ggugaucgcc	ugcauggagc	6720
ccauagggua	cgcuguccug	augaugggaa	gagacaggag	uccugauccc	uangucaaug	6780
acaccuauuu	aaacagcauc	cucucagaau	ucccugucga	cucugacgcu	cgagccugcg	6840
uugaagcccu	cuaaacuauc	uauaugagcu	ucggcacacc	ccauaaaguc	ucggacgcac	6900
ucggccucuu	cagaauugug	ggacauccga	ugguugaugg	agcugacggg	auugaaaaga	6960
ugcgaagguu	aagcaagaag	gucaagaucc	cagaccaguc	uacagcgau	gaccucgggg	7020
cuaucauggc	cgaacuguuu	gugcggaguu	ucguaaagaa	gcacaaaagg	uggcccaacu	7080
gcuccaucaa	ucucccgcca	cgacaccccu	uccaccacgc	ccgccuauug	ggguauugcc	7140
cggcugaaac	ccauccocua	aaacaacacg	cauccugggc	ggcugugggag	uuaaccaggg	7200
aaucgagcc	gccgagacag	uacaaccuug	cagacaucau	ugaugacaag	ucgugcucuc	7260
ccaacaagca	ugagcuauau	ggugcuugga	ugaagucaaa	aacagcuggg	uggcaggaac	7320
aaaagaagcu	cauacuccga	ugguucacug	agaccauggu	uaaaccuucg	gagcuccugg	7380
aagagauuga	ugcacacggc	uuccgagaag	aggauaaguu	gauuggauua	acaccaagg	7440
agagagagcu	gaaauuaaca	ccaagaauug	ucuccuugau	gacauucaag	uucagaaccu	7500
accaaguccu	cacugagagu	augguccggc	augagaucuu	cccgcauuc	cccagauca	7560
ccaugaccan	guccaaccac	gaacucacaa	agagguugau	uagcagaacg	agaccucaau	7620
cuggaggagg	gcgugauguu	cacauaccg	ugaacauaga	uuuccagaaa	uggaacacaa	7680
acaugagaca	cggacugguc	aaacaugucu	ucgagcgacu	ggacaaccuc	uuuggcuuca	7740
ccaacuuaau	cagacgaacu	caugaauacu	uccaggaggc	gaaauacuau	cuggcuagaag	7800
auggaacuaa	ucugucguuc	gacaggaacg	gggaguuauu	agauggccca	uacguuuaca	7860
ccggaucana	cgggggggaa	gagggguuac	gacagaagcc	cuggacaaua	guuaccgugu	7920
guggaauaau	caagguagcu	agagaccuga	aaaucaaaaca	ucagauccac	ggucagggag	7980

auaaucaggu	ggucacccua	auauuuccgg	aucgagaguu	gccuucagau	ccgguggaga	8040
ggagcaagua	cuguagagac	aagagcaguc	aguuccugac	acgucucagu	caauauuucg	8100
cugagguugg	uuugcccgu	aagacugaag	agacauggau	gucaucacgu	cucuaugcuu	8160
acgguaagcg	cauguucuaa	gagggaguuc	cacuaaagau	guuucucaag	aagauaggca	8220
gagcuuucgc	ccucucgaau	gaguuuugucc	cguccucga	ggaagaucug	gccagagucu	8280
ggagugccac	cagcgcagcg	guagagcuug	accuaacucc	cuacguagga	uauugccucg	8340
ggugcugcuu	gucugcgag	gcgaucagaa	aucaccucau	cuacuccccu	guucuggagg	8400
gccucucugcu	gguaaaggcc	uacgagcgua	aguucauuua	cuacgacgga	ggaacaaagc	8460
ggggggcgau	gcccggccua	cguccaaccu	uugagagccu	agucaaaagu	aucugcugga	8520
agccaaaggc	caucggaggg	uggccggauu	ugauguuaga	agaucucauc	aucaaaaggu	8580
ucccugaucc	ggcgacuagc	gcccuggcuc	aaaugaaguc	aauggugcca	uauaccucug	8640
guaucgaccg	ggagaucaua	cuuuccuguc	ucaaccuucc	cuuauugucg	gugguaucuc	8700
cgucaauguu	guuaaaggac	ccggcgccca	ucaacaccu	cacaaccccg	uccgcggcg	8760
acauccugca	agaggucgcc	agagacuau	uuaccgauua	cccacuccaa	aaccgcagc	8820
ucagagcagu	ggucaagaac	gugaagaccg	agcuagacac	auuggccagu	gacuuauuca	8880
aaugugaacc	uuucuuuccu	ccuuuaauga	gcgaauucuu	cucggcaucu	cucccgccau	8940
aucaagacag	gauugnuccg	aagugcucca	cgacuucua	auacaggaga	aaagcugccg	9000
agaggggcuc	cgacucucuc	cucaaccgga	ugaaaaggaa	ugagaucuu	aagaugaugu	9060
uacauuuug	ggcuaccugg	ggaaggagcc	cucuggccag	auuagacacc	agaugucua	9120
caaccugcac	caagcaauua	gcccacacgu	aucggaacca	gucuuuggga	aagcagauc	9180
auggagucuc	agucggccac	cccuuagaac	uguucggucg	aaauaacacc	agccauagau	9240
gccuacauga	ggaggaccac	ggagauuucc	ugcaaaccuu	cgccagcgag	caugugaacc	9300
aaguggacac	cgacaucaac	acaacucugg	ggccguucua	cccuuacaua	ggcucggaga	9360
cgcgagaacg	ggcagucaag	guucgaaaag	gagugaauua	cguaguugag	ccgcuucuga	9420
aaccgcagcu	ucgacuacua	agagccauua	auugguucuu	ucccgaggag	ucagaugcgu	9480
cccauuugcu	gagcaauua	uuagcgucug	uuaccgacau	caauccucaa	gaccacuacu	9540
caucuaccga	aguagggggg	ggcaacgccc	uccaucgcua	cagcugccga	cuauccgaca	9600
aaugagcag	agucaacaac	uuauaucagu	ugcauacuuu	uuuauucug	acaacagagc	9660
gguuagccaa	guacagucga	ggaucaaaaa	acacugacgc	acacuuccag	agcaugauga	9720
uuuaugcaca	aagccgucau	auagaccuca	ucuuaggaguc	ucugcacacc	ggagagaugg	9780
uaccguugga	gugucaucau	cacauugagu	gcauacacug	uauagaggau	auaccgcagc	9840

agccaauccac	gggggacccg	gcuuggacug	aagucaaguu	uccuucaagu	ccucaggagc	9900
ccuuucuuua	caucaggcaa	caagaucugc	cggucacaga	caaacucgag	ccugugccuc	9960
gcaugaacau	cguccgucuu	gccggauugg	guccggaggc	gauuagugag	cuagcgcacu	10020
acuuuguugc	auuccgaguu	auccgggcu	cagagacgga	ugucgacccu	aacgauguuc	10080
ucucguggac	cuggcugagc	cgaauugauc	cugacaaaau	gguugaguau	aucgugcaug	10140
uguucgcuuc	acuggaauug	caucauguau	uaaugucagg	cgugagugug	agcgucagag	10200
augcauucuu	uaagaugcua	gugucuaaaa	gaauucacaga	gacuccgcua	aguucuuuc	10260
auuauucggc	caaccuguu	guugacccuc	agacucgcga	agcacuaaug	agcucuaaa	10320
acggguucag	cccccccgcc	gagacagucc	ccaacgcaaa	ugccgccgca	gccgaaauaa	10380
gaagaugcug	ugcgaacagu	gcgccgucga	ucuuagaau	agcccuucac	agccgugagg	10440
uuguuuggau	gccaggaacg	aacaauuaug	gagacguugu	caucuggucu	cauuacauua	10500
gauuacgguu	cagcgaaguu	aaacuaguug	acauuacacg	auaucagcag	ugguggagac	10560
agucugagcg	agaccccuac	gauuuggucc	cggacaugca	gguucuuugag	agcgaccuag	10620
auacgcugau	gaaacggaua	ccgaggcuca	ugcgcaaggc	gagacguccc	ccucuuacag	10680
uaauucgaga	ggaccuggau	gucgcaguca	ucaaugcuga	ucaucccgcu	cacucugugc	10740
uucagaacaa	auacaggaaa	uugauuuuca	gagagccgaa	gauuauacacg	ggagcugugu	10800
acaaguaccu	cucccuaaaa	ucagaguuga	cagaguucac	cucagcaaug	gugaucggag	10860
acggaacugg	agguauacac	gccgccauga	uggccgaugg	gauagauug	ugguauacaga	10920
cgcucgucua	cuaugaccac	gugacacaac	agggauuauc	cguacaagcc	ccggcagcau	10980
uggaucuucu	gcgcggggca	cccucuggua	ggcucuugaa	uccgggaaga	uucgcaucau	11040
uugggucuga	ccuaacugac	ccucgauuaa	cagccuacuu	ugaucaauau	ccccguuca	11100
agguggacac	ucuaugguu	gacgcagagg	gcgacuuuug	ggacaagccu	uccaaguuga	11160
aucaauacuu	ugagaacauc	auugcuuuga	gacaucgguu	cgugaagaca	aauggacagc	11220
uugucgugaa	gguguauucg	acucaagaca	cugcuaccac	aaugaagca	uucagaaaga	11280
agcugucccc	augcgccauc	aucgugucuc	ucuuucgac	ggaaggcucc	acagaauugc	11340
ucguccuaag	caaucucauc	gcaccagaca	ccccugucga	ccuugagaug	guggagaaua	11400
ucccuaaaac	aacaucccuu	guuccccaga	ggacgacagu	gaaaugcuau	ucccgacgag	11460
uagcgugcau	caguaaaagg	uggggacuua	ucagauucc	gagcauagcc	cuugaagucc	11520
aaccguuccu	ucacuacauc	acaaaggguca	ucucagacaa	aggaacacaa	cugagucuca	11580
uggcgguagc	ugacacaaug	aucaacaguu	acaagaaggc	uauucacccc	cgaguguucg	11640
aucuacaccg	gcauagggcc	gcacuggguu	ucgggaggag	auccuugcau	cucaucuggg	11700
ggaugaucau	cucaccaauc	gcuuaccagc	auuuugagaa	uccggccaag	uugauggaug	11760

```

uccuggacau guugaccaau acaucucag cuuucuuau aucgauucgucg ucaggauuug      11820
accugucuuu uagugucagu gcagaccgag auguccggau ugacagcaaa cuugucagac      11880
ucccgcuauu cgaaggauca gaccuaaaau ucaugaaaac caucaugucu acccuoggau      11940
cuguguucaa ccaggucgag ccuuuuuagg ggauucgccau aaacccuucu aaacuaauga      12000
cugucaagag gacacaggag uuacguuaca acaaccuaau uuacacuaag gaugccaucc      12060
uauuccccaa ugaagcggca aaaaacacug ccccgcuucg agccaacaug guauaccccg      12120
uccgggggaga ucuaucgcc ccuaccgauc gcuaaccaau caugacucua gucagcgaug      12180
agacaacacc ucagcacucu ccuccagagg augaggcaua acugaauccu ccugaaggc      12240
ucacaugucc cacgcgacgc aagaauaac gacaagcaac ucgcccuaau aacugugauu      12300
aauaaaaaac cgauuauuca guugcuugag ggaguuucaa uccguucagu guaugauagg      12360
aaguuncuga gauggugggg auuagggggc accuagagua uguuugucg uuuuauugcu      12420
cgu                                                                    12423

```

<210> 3
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Rhabdovirus Farmington
 <400> 3

```

Met Ala Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gln His Leu Ile Thr Glu Arg His
1          5          10          15

Ser Leu Gln Ala Thr Leu Ser Arg Ala Ser Lys Thr Arg Ala Glu Glu
          20          25          30

Phe Val Lys Asp Phe Tyr Leu Gln Glu Gln Tyr Ser Val Pro Thr Ile
          35          40          45

Pro Thr Asp Asp Ile Ala Gln Ser Gly Pro Met Leu Leu Gln Ala Ile
          50          55          60

Leu Ser Glu Glu Tyr Thr Lys Ala Thr Asp Ile Ala Gln Ser Ile Leu
65          70          75          80

Trp Asn Thr Pro Thr Pro Asn Gly Leu Leu Arg Glu His Leu Asp Ala
          85          90          95

Asp Gly Gly Gly Ser Phe Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ile Arg Pro
          100          105          110

Ser Asp Glu Ala Asn Ala Trp Ala Ala Arg Ile Ser Asp Ser Gly Leu
          115          120          125

```

Gly	Pro	Val	Phe	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Ile	Ile	Gly	Trp	Ser	130	135	140
Gly	Arg	Gly	Glu	Thr	Ser	Arg	Val	Gln	Gln	Asn	Ile	Gly	Gln	Lys	Trp	145	150	155
Leu	Met	Asn	Leu	Asn	Ala	Ile	Phe	Gly	Thr	Thr	Ile	Thr	His	Pro	Thr	165	170	175
Thr	Val	Arg	Leu	Pro	Ile	Asn	Val	Val	Asn	Asn	Ser	Leu	Ala	Val	Arg	180	185	190
Asn	Gly	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Trp	Leu	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Ser	Pro	Gln	195	200	205
Ser	Gln	Asp	Ala	Phe	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ile	Arg	Pro	Cys	Cys	Ser	Gly	210	215	220
Tyr	Leu	Gly	Leu	Leu	His	Arg	Val	Gln	Glu	Ile	Asp	Glu	Met	Glu	Pro	225	230	235
Asp	Phe	Leu	Ser	Asp	Pro	Arg	Ile	Ile	Gln	Val	Asn	Glu	Val	Tyr	Ser	245	250	255
Ala	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Gln	Leu	Gly	Asn	Asp	Phe	Lys	Thr	Ala	Asp	260	265	270
Asp	Glu	Pro	Met	Gln	Val	Trp	Ala	Cys	Arg	Gly	Ile	Asn	Asn	Gly	Tyr	275	280	285
Leu	Thr	Tyr	Leu	Ser	Glu	Thr	Pro	Ala	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Val	Leu	290	295	300
Met	Phe	Ala	Gln	Cys	Met	Leu	Lys	Gly	Asp	Ser	Glu	Ala	Trp	Asn	Ser	305	310	315
Tyr	Arg	Thr	Ala	Thr	Trp	Val	Met	Pro	Tyr	Cys	Asp	Asn	Val	Ala	Leu	325	330	335
Gly	Ala	Met	Ala	Gly	Tyr	Ile	Gln	Ala	Arg	Gln	Asn	Thr	Arg	Ala	Tyr	340	345	350
Glu	Val	Ser	Ala	Gln	Thr	Gly	Leu	Asp	Val	Asn	Met	Ala	Ala	Val	Lys	355	360	365
Asp	Phe	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Leu	Ile			

370

375

380

Pro Arg Pro Ala Asp Val Ala Ser Arg Thr Ser Glu Arg Pro Ser Ile
385 390 395 400

Pro Glu Val Asp Ser Asp Glu Glu Leu Gly Gly Met
405 410

<210> 4
<211> 316
<212> PRT
<213> Rhabdovirus Farmington

<400> 4

Met Glu Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Glu Ala Ala Arg Glu Leu Val Arg
1 5 10 15

Thr Glu Leu Glu Pro Lys Arg Asn Leu Ile Ala Ser Leu Glu Ser Asp
20 25 30

Asp Pro Asp Pro Val Ile Ala Pro Ala Val Lys Pro Lys His Pro Lys
35 40 45

Pro Cys Leu Ser Thr Lys Glu Glu Asp His Leu Pro Ser Leu Arg Leu
50 55 60

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

His Lys Arg Leu Cys Ala Cys Leu Asp Gly Tyr Leu Thr Met Thr Lys
85 90 95

Lys Glu Ala Asn Ala Phe Lys Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala
100 105 110

Val Met Asp Ile Lys Met Glu His Gln Arg Gln Asp Leu Glu Asp Leu
115 120 125

Thr Ala Ala Ile Pro Arg Ile Glu Phe Lys Leu Asn Ala Ile Leu Glu
130 135 140

Asn Asn Lys Glu Ile Ala Lys Ala Val Thr Ala Ala Lys Glu Met Glu
145 150 155 160

Arg Glu Met Ser Trp Gly Glu Ser Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Val
165 170 175

Thr Leu Asp Glu Ser Phe Arg Gly Pro Glu Glu Leu Ser Glu Ser Phe

5

10

180				185				190							
Gly	Ile	Arg	Tyr	Lys	Val	Arg	Thr	Trp	Asn	Glu	Phe	Lys	Lys	Ala	Leu
		195					200					205			
Glu	Thr	Ser	Ile	Val	Asp	Leu	Arg	Pro	Ser	Pro	Val	Ser	Phe	Arg	Glu
	210					215					220				
Leu	Arg	Thr	Met	Trp	Leu	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Phe	Arg	Leu	Ile	Gly
225					230					235					240
Phe	Ala	Phe	Ile	Pro	Thr	Cys	Glu	Arg	Leu	Glu	Thr	Lys	Ala	Lys	Cys
				245					250					255	
Lys	Glu	Thr	Arg	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Met	Arg	Arg
			260					265					270		
Trp	Asp	Leu	Arg	Asp	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu	Lys	Ala	Cys	Val	Val	Met
		275					280					285			
Met	Ile	Arg	Gly	Asn	Glu	Ile	Ala	Ser	Leu	Asn	Gln	Val	Lys	Asp	Val
	290					295					300				
Leu	Pro	Thr	Thr	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Ile	Ala	Tyr				
305					310					315					

<210> 5
<211> 148
<212> PRT
<213> Rhabdovirus Farmington

<400> 5

Met	Arg	Arg	Phe	Phe	Leu	Gly	Glu	Ser	Ser	Ala	Pro	Ala	Arg	Asp	Trp
1				5					10					15	
Glu	Ser	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Tyr	Ala	Val	Glu	Val	Pro	Gln	Ser	His
			20					25					30		
Gly	Ile	Arg	Val	Thr	Gly	Tyr	Phe	Gln	Cys	Asn	Glu	Arg	Pro	Lys	Ser
		35					40					45			
Lys	Lys	Thr	Leu	His	Ser	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Cys	Asp	Ala	Ile	Lys
	50					55					60				
Pro	Val	Arg	Ala	Asp	Ala	Pro	Ser	Leu	Lys	Ile	Ala	Ile	Trp	Thr	Ala
65					70					75					80
Leu	Asp	Leu	Ala	Phe	Val	Lys	Pro	Pro	Asn	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Asp

ES 2 627 529 T3

85

90

95

Ala Ala Val Lys Ala Thr Pro Leu Ile Gly Asn Thr Gln Tyr Thr Val
100 105 110

Gly Asp Glu Ile Phe Gln Met Leu Gly Arg Arg Gly Gly Leu Ile Val
115 120 125

Ile Arg Asn Leu Pro His Asp Tyr Pro Arg Thr Leu Ile Glu Phe Ala
130 135 140

Ser Pro Glu Pro
145

<210> 6

<211> 704

<212> PRT

<213> Rhabdovirus Farmington

<400> 6

5

ES 2 627 529 T3

Met	Leu	Arg	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Ile	Ala	Ile	Ile	Leu	Val	Ser	Leu	1	5	10	15
Leu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Gln	Arg	Ile	20	25	30	
Pro	Leu	Leu	Asn	Asp	Ser	Trp	Asp	Leu	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Asp	Ile	35	40	45	
Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Val	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Ser	His	Asn	Ser	Ser	Glu	50	55	60	
Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Trp	Tyr	Ile	Asn	Arg	Arg	Val	Ala	65	70	75	80
Asp	Thr	Ser	Ile	Pro	Cys	Arg	Gly	Pro	Cys	Leu	Val	Pro	Tyr	Ile	Leu	85	90	95	
His	Gly	Leu	Asn	Asp	Thr	Thr	Val	Ser	Arg	Arg	Gly	Gly	Gly	Trp	Arg	100	105	110	
Arg	Ser	Gly	Met	Lys	Tyr	Pro	Thr	His	Ala	Val	Arg	Leu	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Thr	Asp	Asp	Glu	Arg	Val	Glu	Glu	Asp	Ile	Gly	Tyr	Val	Asn	Val	Ser	130	135	140	
Ala	Leu	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Pro	Val	Glu	Met	Ala	Ile	Pro	Thr	Ile				

ES 2 627 529 T3

145					150					155					160
Pro	Asp	Cys	Thr	Ser	Ala	Ile	His	Pro	Arg	Ser	Glu	Val	Thr	Val	Pro
				165					170					175	
Val	Lys	Leu	Asp	Val	Met	Arg	Arg	Asn	Pro	Asn	Tyr	Pro	Pro	Ile	Arg
			180					185					190		
Ala	Trp	Ser	Cys	Ile	Gly	Gln	Lys	Ile	Thr	Asn	Arg	Cys	Asp	Trp	Ala
		195					200					205			
Leu	Phe	Gly	Glu	Asn	Leu	Ile	Tyr	Thr	Gln	Val	Glu	Ala	Ser	Ser	Leu
	210					215					220				
Ala	Phe	Lys	His	Thr	Arg	Ala	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	Ser	Asn	Gly	Ile
225					230					235					240
Asp	Ala	Glu	Gly	Arg	Ala	Val	Pro	Tyr	Ile	Leu	Gly	Asp	Ile	Glu	Pro
				245					250					255	
Gly	Tyr	Cys	Arg	Thr	Leu	Phe	Asn	Thr	Trp	Val	Ser	Ser	Glu	Ile	Val
			260					265					270		
Ser	Cys	Thr	Pro	Ile	Glu	Leu	Val	Leu	Val	Asp	Leu	Asn	Pro	Leu	Ser
		275					280					285			
Pro	Gly	His	Gly	Gly	Tyr	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Asn	Gly	Asp	Lys	Val
	290					295					300				
Asp	Val	His	Asp	Lys	His	Ala	Trp	Asp	Gly	Asp	Asn	Lys	Met	Trp	Arg
305					310					315					320
Trp	Val	Tyr	Glu	Lys	Lys	Asp	Pro	Cys	Ala	Phe	Glu	Leu	Val	Ser	Arg
				325					330					335	
Glu	Val	Cys	Leu	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Gly	Ser	Arg	Leu	Arg	Gly	Ala
			340					345					350		
Thr	Pro	Pro	Gln	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	His	Ser	Gly	Lys	Ala
		355					360					365			
Phe	Asp	Leu	Lys	Gly	Ala	Arg	Arg	Ile	Thr	Pro	Ile	Ser	Cys	Lys	Ile
	370					375					380				
Asp	Met	Glu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Gly	Val	Ile	Leu	Gly
385					390					395					400

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

Phe Ser Ser Leu Gly Gly Phe Phe Met Arg Pro Leu Ile Ala Leu Ala
660 665 670

Ala Ile Val Thr Ser Ile Ile Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Arg Val Leu
675 680 685

Cys Ala Ala Ser Cys Ser Thr His Arg Arg Val Arg Gln Asp Ser Trp
690 695 700

<210> 7
<211> 2129
<212> PRT
<213> Rhabdovirus Farmington
<400> 7

5

Met Ala Phe Asp Pro Asn Trp Gln Arg Glu Gly Tyr Glu Trp Asp Pro
1 5 10 15

Ser Ser Glu Gly Arg Pro Thr Asp Glu Asn Glu Asp Asp Arg Gly His
20 25 30

Arg Pro Lys Thr Arg Leu Arg Thr Phe Leu Ala Arg Thr Leu Asn Ser
35 40 45

Pro Ile Arg Ala Leu Phe Tyr Thr Ile Phe Leu Gly Ile Arg Ala Val
50 55 60

Trp Asp Gly Phe Lys Arg Leu Leu Pro Val Arg Thr Glu Lys Gly Tyr
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Glu Cys Val Thr Tyr Gly Met Ile Gly Cys Asp Glu
85 90 95

Cys Val Ile Asp Pro Val Arg Val Val Ile Glu Leu Thr Glu Met Gln
100 105 110

Leu Pro Ile Lys Gly Lys Gly Ser Thr Arg Leu Arg Ala Met Ile Thr
115 120 125

Glu Asp Leu Leu Thr Gly Met Arg Thr Ala Val Pro Gln Ile Arg Val
130 135 140

Arg Ser Lys Ile Leu Ala Glu Arg Leu Gly Arg Ala Ile Gly Arg Glu
145 150 155 160

Thr Leu Pro Ala Met Ile His His Glu Trp Ala Phe Val Met Gly Lys
165 170 175

10

Ile Leu Thr Phe Met Ala Asp Asn Val Gly Met Asn Ala Asp Thr Val
 180 185 190
 Glu Gly Val Leu Ser Leu Ser Glu Val Thr Arg Arg Trp Asp Ile Gly
 195 200 205
 Asn Ser Val Ser Ala Val Phe Asn Pro Asp Gly Leu Thr Ile Arg Val
 210 215 220
 Glu Asn Thr Gly Tyr Ile Met Thr Arg Glu Thr Ala Cys Met Ile Gly
 225 230 235 240
 Asp Ile His Ala Gln Phe Ala Ile Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Leu Asp
 245 250 255
 Glu Val Ile Gly Thr Arg Thr Ser Leu Ser Pro Ala Glu Leu Thr Ser
 260 265 270
 Leu Lys Leu Trp Gly Leu Asn Val Leu Lys Leu Leu Gly Arg Asn Gly
 275 280 285
 Tyr Glu Val Ile Ala Cys Met Glu Pro Ile Gly Tyr Ala Val Leu Met
 290 295 300
 Met Gly Arg Asp Arg Ser Pro Asp Pro Tyr Val Asn Asp Thr Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ile Leu Ser Glu Phe Pro Val Asp Ser Asp Ala Arg Ala Cys
 325 330 335
 Val Glu Ala Leu Leu Thr Ile Tyr Met Ser Phe Gly Thr Pro His Lys
 340 345 350
 Val Ser Asp Ala Phe Gly Leu Phe Arg Met Leu Gly His Pro Met Val
 355 360 365
 Asp Gly Ala Asp Gly Ile Glu Lys Met Arg Arg Leu Ser Lys Lys Val
 370 375 380
 Lys Ile Pro Asp Gln Ser Thr Ala Ile Asp Leu Gly Ala Ile Met Ala
 385 390 395 400
 Glu Leu Phe Val Arg Ser Phe Val Lys Lys His Lys Arg Trp Pro Asn
 405 410 415
 Cys Ser Ile Asn Leu Pro Pro Arg His Pro Phe His His Ala Arg Leu
 420 425 430

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

675		680		685
Lys Pro Trp Thr Ile Val Thr Val Cys Gly Ile Tyr Lys Val Ala Arg				
690		695		700
Asp Leu Lys Ile Lys His Gln Ile Thr Gly Gln Gly Asp Asn Gln Val				
705		710		715
Val Thr Leu Ile Phe Pro Asp Arg Glu Leu Pro Ser Asp Pro Val Glu				
		725		730
				735
Arg Ser Lys Tyr Cys Arg Asp Lys Ser Ser Gln Phe Leu Thr Arg Leu				
		740		745
				750
Ser Gln Tyr Phe Ala Glu Val Gly Leu Pro Val Lys Thr Glu Glu Thr				
		755		760
				765
Trp Met Ser Ser Arg Leu Tyr Ala Tyr Gly Lys Arg Met Phe Leu Glu				
		770		775
				780
Gly Val Pro Leu Lys Met Phe Leu Lys Lys Ile Gly Arg Ala Phe Ala				
785		790		795
				800
Leu Ser Asn Glu Phe Val Pro Ser Leu Glu Glu Asp Leu Ala Arg Val				
		805		810
				815
Trp Ser Ala Thr Ser Ala Ala Val Glu Leu Asp Leu Thr Pro Tyr Val				
		820		825
				830
Gly Tyr Val Leu Gly Cys Cys Leu Ser Ala Gln Ala Ile Arg Asn His				
		835		840
				845
Leu Ile Tyr Ser Pro Val Leu Glu Gly Pro Leu Leu Val Lys Ala Tyr				
		850		855
				860
Glu Arg Lys Phe Ile Asn Tyr Asp Gly Gly Thr Lys Arg Gly Ala Met				
865		870		875
				880
Pro Gly Leu Arg Pro Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ser Ile Cys Trp				
		885		890
				895
Lys Pro Lys Ala Ile Gly Gly Trp Pro Val Leu Met Leu Glu Asp Leu				
		900		905
				910
Ile Ile Lys Gly Phe Pro Asp Pro Ala Thr Ser Ala Leu Ala Gln Leu				
		915		920
				925

Lys Ser Met Val Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Asp Arg Glu Ile Ile Leu
 930 935 940

Ser Cys Leu Asn Leu Pro Leu Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Met Leu
 945 950 955 960

Leu Lys Asp Pro Ala Ala Ile Asn Thr Ile Thr Thr Pro Ser Ala Gly
 965 970 975

Asp Ile Leu Gln Glu Val Ala Arg Asp Tyr Val Thr Asp Tyr Pro Leu
 980 985 990

Gln Asn Pro Gln Leu Arg Ala Val Val Lys Asn Val Lys Thr Glu I
 995 1000 1005

Asp Thr Leu Ala Ser Asp Leu Phe Lys Cys Glu Pro Phe Phe Pro
 1010 1015 1020

Pro Leu Met Ser Asp Ile Phe Ser Ala Ser Leu Pro Ala Tyr Gln
 1025 1030 1035

Asp Arg Ile Val Arg Lys Cys Ser Thr Thr Ser Thr Ile Arg Arg
 1040 1045 1050

Lys Ala Ala Glu Arg Gly Ser Asp Ser Leu Leu Asn Arg Met Lys
 1055 1060 1065

Arg Asn Glu Ile Asn Lys Met Met Leu His Leu Trp Ala Thr Trp
 1070 1075 1080

Gly Arg Ser Pro Leu Ala Arg Leu Asp Thr Arg Cys Leu Thr Thr
 1085 1090 1095

Cys Thr Lys Gln Leu Ala Gln Gln Tyr Arg Asn Gln Ser Trp Gly
 1100 1105 1110

Lys Gln Ile His Gly Val Ser Val Gly His Pro Leu Glu Leu Phe
 1115 1120 1125

Gly Arg Ile Thr Pro Ser His Arg Cys Leu His Glu Glu Asp His
 1130 1135 1140

Gly Asp Phe Leu Gln Thr Phe Ala Ser Glu His Val Asn Gln Val
 1145 1150 1155

Asp Thr Asp Ile Thr Thr Thr Leu Gly Pro Phe Tyr Pro Tyr Ile
 1160 1165 1170

Gly	Ser	Glu	Thr	Arg	Glu	Arg	Ala	Val	Lys	Val	Arg	Lys	Gly	Val
1175						1180					1185			
Asn	Tyr	Val	Val	Glu	Pro	Leu	Leu	Lys	Pro	Ala	Val	Arg	Leu	Leu
1190						1195					1200			
Arg	Ala	Ile	Asn	Trp	Phe	Ile	Pro	Glu	Glu	Ser	Asp	Ala	Ser	His
1205						1210					1215			
Leu	Leu	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Thr	Asp	Ile	Asn	Pro	Gln
1220						1225					1230			
Asp	His	Tyr	Ser	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Asn	Ala	Val	His
1235						1240					1245			
Arg	Tyr	Ser	Cys	Arg	Leu	Ser	Asp	Lys	Leu	Ser	Arg	Val	Asn	Asn
1250						1255					1260			
Leu	Tyr	Gln	Leu	His	Thr	Tyr	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Arg	Leu
1265						1270					1275			
Thr	Lys	Tyr	Ser	Arg	Gly	Ser	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala	His	Phe	Gln
1280						1285					1290			
Ser	Met	Met	Ile	Tyr	Ala	Gln	Ser	Arg	His	Ile	Asp	Leu	Ile	Leu
1295						1300					1305			
Glu	Ser	Leu	His	Thr	Gly	Glu	Met	Val	Pro	Leu	Glu	Cys	His	His
1310						1315					1320			
His	Ile	Glu	Cys	Asn	His	Cys	Ile	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Glu	Pro
1325						1330					1335			
Ile	Thr	Gly	Asp	Pro	Ala	Trp	Thr	Glu	Val	Lys	Phe	Pro	Ser	Ser
1340						1345					1350			
Pro	Gln	Glu	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ile	Arg	Gln	Gln	Asp	Leu	Pro	Val
1355						1360					1365			
Lys	Asp	Lys	Leu	Glu	Pro	Val	Pro	Arg	Met	Asn	Ile	Val	Arg	Leu
1370						1375					1380			
Ala	Gly	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Ile	Ser	Glu	Leu	Ala	His	Tyr	Phe
1385						1390					1395			
Val	Ala	Phe	Arg	Val	Ile	Arg	Ala	Ser	Glu	Thr	Asp	Val	Asp	Pro
1400						1405					1410			

Asn Asp 1415	Val Leu Ser Trp Thr 1420	Trp Leu Ser Arg Ile 1425	Asp Pro Asp
Lys Leu 1430	Val Glu Tyr Ile Val 1435	His Val Phe Ala Ser 1440	Leu Glu Trp
His His 1445	Val Leu Met Ser Gly 1450	Val Ser Val Ser Val 1455	Arg Asp Ala
Phe Phe 1460	Lys Met Leu Val Ser 1465	Lys Arg Ile Ser Glu 1470	Thr Pro Leu
Ser Ser 1475	Phe Tyr Tyr Leu Ala 1480	Asn Leu Phe Val Asp 1485	Pro Gln Thr
Arg Glu 1490	Ala Leu Met Ser Ser 1495	Lys Tyr Gly Phe Ser 1500	Pro Pro Ala
Glu Thr 1505	Val Pro Asn Ala Asn 1510	Ala Ala Ala Ala Glu 1515	Ile Arg Arg
Cys Cys 1520	Ala Asn Ser Ala Pro 1525	Ser Ile Leu Glu Ser 1530	Ala Leu His
Ser Arg 1535	Glu Val Val Trp Met 1540	Pro Gly Thr Asn Asn 1545	Tyr Gly Asp
Val Val 1550	Ile Trp Ser His Tyr 1555	Ile Arg Leu Arg Phe 1560	Ser Glu Val
Lys Leu 1565	Val Asp Ile Thr Arg 1570	Tyr Gln Gln Trp Trp 1575	Arg Gln Ser
Glu Arg 1580	Asp Pro Tyr Asp Leu 1585	Val Pro Asp Met Gln 1590	Val Leu Glu
Ser Asp 1595	Leu Asp Thr Leu Met 1600	Lys Arg Ile Pro Arg 1605	Leu Met Arg
Lys Ala 1610	Arg Arg Pro Pro Leu 1615	Gln Val Ile Arg Glu 1620	Asp Leu Asp
Val Ala 1625	Val Ile Asn Ala Asp 1630	His Pro Ala His Ser 1635	Val Leu Gln
Asn Lys	Tyr Arg Lys Leu Ile	Phe Arg Glu Pro Lys	Ile Ile Thr

1640		1645		1650
Gly Ala Val Tyr Lys Tyr Leu Ser Leu Lys Ser Glu Leu Thr Glu	1655	1660		1665
Phe Thr Ser Ala Met Val Ile Gly Asp Gly Thr Gly Gly Ile Thr	1670	1675		1680
Ala Ala Met Met Ala Asp Gly Ile Asp Val Trp Tyr Gln Thr Leu	1685	1690		1695
Val Asn Tyr Asp His Val Thr Gln Gln Gly Leu Ser Val Gln Ala	1700	1705		1710
Pro Ala Ala Leu Asp Leu Leu Arg Gly Ala Pro Ser Gly Arg Leu	1715	1720		1725
Leu Asn Pro Gly Arg Phe Ala Ser Phe Gly Ser Asp Leu Thr Asp	1730	1735		1740
Pro Arg Phe Thr Ala Tyr Phe Asp Gln Tyr Pro Pro Phe Lys Val	1745	1750		1755
Asp Thr Leu Trp Ser Asp Ala Glu Gly Asp Phe Trp Asp Lys Pro	1760	1765		1770
Ser Lys Leu Asn Gln Tyr Phe Glu Asn Ile Ile Ala Leu Arg His	1775	1780		1785
Arg Phe Val Lys Thr Asn Gly Gln Leu Val Val Lys Val Tyr Leu	1790	1795		1800
Thr Gln Asp Thr Ala Thr Thr Ile Glu Ala Phe Arg Lys Lys Leu	1805	1810		1815
Ser Pro Cys Ala Ile Ile Val Ser Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser	1820	1825		1830
Thr Glu Cys Phe Val Leu Ser Asn Leu Ile Ala Pro Asp Thr Pro	1835	1840		1845
Val Asp Leu Glu Met Val Glu Asn Ile Pro Lys Leu Thr Ser Leu	1850	1855		1860
Val Pro Gln Arg Thr Thr Val Lys Cys Tyr Ser Arg Arg Val Ala	1865	1870		1875

Cys 1880	Ile	Ser	Lys	Arg	Trp	Gly 1885	Leu	Phe	Arg	Ser	Pro 1890	Ser	Ile	Ala
Leu 1895	Glu	Val	Gln	Pro	Phe	Leu 1900	His	Tyr	Ile	Thr	Lys 1905	Val	Ile	Ser
Asp 1910	Lys	Gly	Thr	Gln	Leu	Ser 1915	Leu	Met	Ala	Val	Ala 1920	Asp	Thr	Met
Ile 1925	Asn	Ser	Tyr	Lys	Lys	Ala 1930	Ile	Ser	Pro	Arg	Val 1935	Phe	Asp	Leu
His 1940	Arg	His	Arg	Ala	Ala	Leu 1945	Gly	Phe	Gly	Arg	Arg 1950	Ser	Leu	His
Leu 1955	Ile	Trp	Gly	Met	Ile	Ile 1960	Ser	Pro	Ile	Ala	Tyr 1965	Gln	His	Phe
Glu 1970	Asn	Pro	Ala	Lys	Leu	Met 1975	Asp	Val	Leu	Asp	Met 1980	Leu	Thr	Asn
Asn 1985	Ile	Ser	Ala	Phe	Leu	Ser 1990	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly 1995	Phe	Asp	Leu
Ser 2000	Phe	Ser	Val	Ser	Ala	Asp 2005	Arg	Asp	Val	Arg	Ile 2010	Asp	Ser	Lys
Leu 2015	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Phe 2020	Glu	Gly	Ser	Asp	Leu 2025	Lys	Phe	Met
Lys 2030	Thr	Ile	Met	Ser	Thr	Leu 2035	Gly	Ser	Val	Phe	Asn 2040	Gln	Val	Glu
Pro 2045	Phe	Lys	Gly	Ile	Ala	Ile 2050	Asn	Pro	Ser	Lys	Leu 2055	Met	Thr	Val
Lys 2060	Arg	Thr	Gln	Glu	Leu	Arg 2065	Tyr	Asn	Asn	Leu	Ile 2070	Tyr	Thr	Lys
Asp 2075	Ala	Ile	Leu	Phe	Pro	Asn 2080	Glu	Ala	Ala	Lys	Asn 2085	Thr	Ala	Pro
Leu 2090	Arg	Ala	Asn	Met	Val	Tyr 2095	Pro	Val	Arg	Gly	Asp 2100	Leu	Phe	Ala
Pro 2105	Thr	Asp	Arg	Ile	Pro	Ile 2110	Met	Thr	Leu	Val	Ser 2115	Asp	Glu	Thr

Thr Pro Gln His Ser Pro Pro Glu Asp Glu Ala
2120 2125

5 <210> 8
<211> 1236
<212> ADN
<213> Rhabdovirus Farmington

<400> 8

```

atggctcgtc cgtagctgc tgcgcaacat ctcataaccg agcgtcattc ccttcaggcg      60
actctgtcgc gggcgtccaa gaccagagcc gaggaattcg tcaaagattt ctaccttcaa      120
gagcagtatt ctgtcccgac catcccgacg gacgacattg occagtctgg gcccatgctg      180
cttcaggcca tcctgagcga ggaatacaca aaggccactg acatagccca atccatcctc      240
tggaacactc ccacacccaa cgggctcctc agagagcatc tagatgccga tgggggaggc      300
tcattcacag cgctgcccgc gtctgcaatc agaccacagc acgaggcgaa tgcattgggc      360
gctcgcatct ccgactcagg gttggggcct gtcttctatg cagccctcgc tgettacatc      420
atcggtcgtg caggaagagg agagactagc cgcgtgcagc agaacatagg tcagaaatgg      480
ctgatgaacc tgaacgcaat cttcggcacc acgatcacc atccaacaac cgtgcgtctg      540
ccaatcaacg tcgtcaacaa cagcctcgca gtgaggaacg gacttgctgc cacactctgy      600
ctatactacc gttcatcacc tcagagtcag gacgcgttct tctatgggct catccgtccc      660
tggtgcagtg gatatctcgg cctgctacat cgggtgcagg agattgatga gatggagccg      720
gacttctca gtgacccccg gatcatccag gtgaatgagg tctacagtgc actcagagcc      780
ctggttcaac tgggaaacga cttcaagacc gccgatgatg agcccatgca ggtctgggcg      840
tgcaggggaa tcaacaacgg atatctgaca tatctctcag aaactcctgc gaagaaagga      900
gctgttgtgc ttatgtttgc ccaatgcatt ctgaagggcg actctgaggc ctggaacagc      960
taccgcactg caacctgggt gatgccctat tgcgacaatg tggccctagg agcgatggca     1020
ggctacatcc aagcccgcca gaacaccagg gcatatgagg tctcagccca gacaggtctc     1080
gacgtcaaca tggccgcggt caaggacttt gaggccagtt caaaacccaa ggtgctcca     1140
atctcgtgta tcccacgccc cgctgatgtc gcatcccgca cctctgagcg cccatctatt     1200
cctgagggtg acagcgacga agagctcgga ggaatg                               1236

```

10

<210> 9
<211> 948
<212> ADN
15 <213> Rhabdovirus Farmington

<400> 9

```

atggaggact atttgtctag cttagaggcc gcgagagagc tcgtccggac ggagctggag      60
cccaagcgta acctcatagc cagcttagag tccgacgata ccgatccggt aatagcgcca     120

```

ES 2 627 529 T3

goggtaaaac caaaacatcc caagccatgc ctgagcacta aagaagagga tcatctcccc 180
tctcttcgcc tactattcgg cgcaaaacga gacacctcgg tgggcgtaga gcagactctc 240
cacaagcgtc tctgcgcttg tctgcacggt tacctgacca tgacgaagaa agaggccaat 300
gcctttaagg ccgcggctga agcagcagca ttagcagtcg tgacattaa gatggagcat 360
cagcgccagg atctagagga tctgaccgct gctatcccta ggatagaatt caaactcaat 420
gccatcctgg aaaacaacaa ggagatagcc aaggctgtaa ctgctgctaa ggagatggag 480
cgggagatgt cgtgggggga aagcgccgcc agctcgctca agtctgtcac cctagatgag 540
tcgttttaggg gccctgaaga gctttcagag tcatttggca tccgatataa ggtcagaacc 600
tggaatgagt tcaagaaggc gctggaaacc agcattgtgg acctgaggcc tagccctgtt 660
tcatttaggg aattacggac tatgtggctg tctcttgaca cctcctttag gctcattggg 720
tttgccttca ttcccacatg cgagcgctg gagaccaaag ccaaagcaa ggagacaagg 780
actctactcc cccttgacga gtcgatcatg cgaagatggg acctgcggga tccaaccatc 840
ttggagaaag cctgcgtagt aatgatgatc cgtgggaatg agattgcac gctgaatcag 900
gtaaaagatg ttctcccgac cacaattcgt ggggtggaaga tcgcttat 948

<210> 10
<211> 444
<212> ADN
<213> Rhabdovirus Farmington

<400> 10

atgcgtcggg tcttttttagg agagagcagt gccctgcga gggactggga gtccgagcga 60
cctccccct atgctgttga ggtccctcaa agtcacggga taagagtcac cgggtacttc 120
cagtgcacag agcgtccgaa atccaagaag accctccaca gcttcgctgt aaaactctgc 180
gacgcaatta agcgggttcg agcggatgct cccagcttga agatagcaat atggacggct 240
ctagatctgg ccttcgtgaa accctccaat ggaactgtaa caatagatgc ggcggtgaaa 300
gctacaccgc taatcgggaa caccagtagc accgtaggcg atgaaatctt ccagatgcta 360
gggagaaggg gtggcctgat cgtcatcagg aacttaccoc atgattatcc tcgaacgttg 420
attgagttcg cctctccgga gcct 444

<210> 11
<211> 2112
<212> ADN
<213> Rhabdovirus Farmington

<400> 11

atgctcagga tccagatccc tccgattgct atcattctgg taagtctcct cacactcgac 60
ctgtccggtg caaggaggac aaccacacaa agaatccctc tccttaatga ttcgtgggat 120

ES 2 627 529 T3

ttgttctcga gctatggcga cattcccgaa gaacttgtcg tataaccagaa ctacagccac	180
aattcctccg agttaacccc tcctggcttc gagagatggg acataaacccg aagagtggca	240
gacaattcca taccggtgcag gggccctgt ctagtgccct acatccttca tggcctcaat	300
gacacaactg tctctcgacg gggaggagga tggcgaaggt ccggaatgaa gtaccaaac	360
cacgctgtca ggctaggccc ttcaacagac gacgagagag ttgaggaaga catcggtac	420
gtcaatgtct ccgcactatc ctgcacaggg tcgcccgttg agatggcgat accaacaatc	480
cccgactgca ccagtgcctat ccattccacga tccgaggtta ctgtgcccgt caagctcgat	540
gtcatgagac gaaatoccaa ctaccctccc attagagcgt ggtcgtgcat cggacagaaa	600
atcaaccaacc gatgtgattg ggcaactctt ggcgagaacc tcatatatac tcaagttgaa	660
gctagctctc tagcattcaa gcacacaaga gcctctcttt tgaacgaatc caacgggata	720
gacgctgaag gacgtgcagt tccctatatc ctgggggata tcgaaccccg gtactgccga	780
accctattca acacatgggt ctctagttag atcgtgtcat gcacgcccac cgaactgtc	840
ctagttgacc tgaacccttt gtccccggga catggcggat atgctgtatt gctgccaaac	900
ggagacaaag tggatgtaca cgacaagcat gcatgggatg gggacaacaa aatgtggaga	960
tgggtgtacg agaagaaaga tccctgtgag ttcgagctgg tatccaggga agtgtgtctt	1020
ttctcactga gtaggggtag tagactgaga ggagcaaccc ctccccaaag agagctctc	1080
acctgcccgc attcgggaaa ggcatttgac ctgaaggggg ccggaaggat tacaccatt	1140
tcatgcaaaa tcgacatgga atatgacttg ctgtcactac caaccggagt catcctaggc	1200
ctccacctat cagaactcgg gacctccttt ggcaacctct caatgagtct tgaaatgtat	1260
gaacctgcca caactctgac ccctgagcaa atcaacttct cgcttaaga gctgggaagc	1320
tggaccgagg ctcaactgaa gagcctgtct cactcaatct gcctctccac attctccata	1380
tgggaactat cggttgggat gatcgatcta aaccctacca gggcagcaag ggccttgctc	1440
catgatgata acatactggc aacattcgag aacggctcact ttccatcgt cagatgtcgt	1500
ccggaatatag ttcaagtccc ttcgcatcct cgagcatgtc acatggatct ccgcccttat	1560
gacaagcaat cacgggcac caccctgggt gtcccccttg acaacagcac tgccctcctg	1620
gtccccgaca acatcgtggg tgaaggagta gaggccagtc tatgcaacca ctccgttgc	1680
atcacgctgt cgaagaacag aactcaactc tacagcctct atccccaggg tcgtcctgtg	1740
cttcgacaga aaggtgccgt ggagctcccg acgatagggc ccctccagtt acatcctgcc	1800
actcgagtgg acctttatac actgaaagag ttccaggagg accgaatagc gcgcagtcga	1860
gtcacagaca tcaaggctgc cgttgacgat ctgcgtgcga agtggcgtaa aggcaaattt	1920
gaggcggaac ccacgggagg gggactttgg tcggcgattg tgggagtctt cagttctctc	1980
gggggggttct tcatgaggcc cttgattgct ctgcggcgga tagtgacctc aatcatcatc	2040
ctgtatatcc ttctgcgtgt actgtgtgct gcctcatgtt cgacacaccg aagagtaagg	2100
caggactctt gg	2112

<210> 12
 <211> 6387
 <212> ADN
 <213> Rhabdovirus Farmington

5

<400> 12

atggccttcg acccgaactg gcagagagaa ggttatgaat gggatccgtc aagtgagggc	60
agaccgaccg atgagaacga agacgacaga ggtcatcggc caaaaacgag acttcgtaca	120
ttccttgccc gcaogttaa tagccctatc cgagccctat tctacacaat attcctagga	180
attcgagcgg tttgggacgg gttcaaaaga ctctacctg tgaggaccga aaagggttat	240
gcgaggtttt ctgagtgcgt cacatatgga atgatcggat gtgatgagtg tgtaatatagac	300
cgggtgaggg ttgtcattga gctgaccgag atgcagttac cgattaaagg caaaggctct	360
acgaggttga gagcaatgat aactgaagac cttctcacgg ggatgcgcac agccgtgcct	420
cagatcagag tgagatcgaa gatcctagca gagcggttag ggagagcaat cggccgagag	480
accttgccgg caatgatcca tcatgagtgg gcatttgtga tggggaagat tctcactttc	540
atggcagaca atgtgggtat gaacgctgac acggtcgagg gcgttctatc actatcagag	600
gtcacacggc gatgggatat cggcaactct gtgtccgcag tgttcaatcc tgatggcctt	660
actatcagag tagaaaacac gggttacatc atgaccagag agactgcctg catgatcgga	720
gacattcatg ctcaatttgc aatccaatac ctagctgcat acctagacga ggtgatcggc	780
acaaggacgt ctctctcacc cgccgaactg acctctctca aactatgggg acttaacgtc	840
ctgaaactcc taggacggaa cggttatgag gtgatcgctt gcatggagcc catagggtac	900
gotgtcctga tgatgggaag agacaggagt cctgatccct atgtcaatga cacctattta	960
aacagcatcc tctcagaatt cctgtcgac tctgacgctc gagcctgctg tgaagccctc	1020
ttaactatct atatgagctt cggcacaccc cataaagtct cggacgcatt cggcctcttc	1080
agaatgttg gacatccgat ggttgatgga gctgacggga ttgaaaagat gcgaaggtta	1140
agcaagaagg tcaagatccc agaccagtct acagcgatcg acctcggggc tatcatggcc	1200
gaactgtttg tgcgaggttt cgtaaagaag cacaaaagggt ggcccaactg ctccatcaat	1260
ctcccgccac gacacccctt ccaccacgcc cgccctatgtg ggtatgtccc ggctgaaacc	1320
catccctaa acaacactgc atcctgggcg gctgtggagt tcaaccagga attcgagccg	1380
cogagacagt acaaccttgc agacatcatt gatgacaagt cgtgctctcc caacaagcat	1440
gagctatatg gtgcttgat gaagtcaaaa acagctgggt ggcaggaaca aaagaagctc	1500
atactccgat ggttcactga gaccatggtt aaaccttcgg agctcctgga agagattgat	1560

gcacacggct	tccgagaaga	ggataagttg	attggattaa	caccaaagga	gagagagctg	1620
aaattaacac	caagaatgtt	ctccttgatg	acattcaagt	tcagaacctc	ccaagtcctc	1680
actgagagta	tggtcgccga	tgagatcctc	cgcacttcc	cccagatcac	catgaccatg	1740
tccaaccacg	aactcacaaa	gaggttgatt	agcagaacga	gacctcaatc	tggaggaggg	1800
cgtgatgttc	acatcacctg	gaacatagat	ttccagaaat	ggaacacaaa	catgagacac	1860
ggactgggtca	aacatgtctt	cgagcgactg	gacaacctct	ttggcttcac	caacttaatc	1920
agacgaactc	atgaatactt	ccaggaggcg	aaatactatc	tggctgaaga	tggaaactaat	1980
ctgtcgttcg	acaggaacgg	ggagttaata	gatggcccat	acgtttacac	cggatcatac	2040
ggggggaacg	aggggttacg	acagaagccc	tggacaatag	ttaccgtgtg	tggaaatatac	2100
aaggtagcta	gagacctgaa	aatcaaacat	cagatcacog	gtcagggaga	taatcaggtg	2160
gtcacccctaa	tatttcggga	togagagttg	ccttcagatc	cggtggagag	gagcaagtac	2220
tgtagagaca	agagcagtca	gttcctgaca	cgtctcagtc	aatatcttgc	tgaggttggt	2280
ttgcccgtca	agactgaaga	gacatggatg	tcatcacgtc	tctatgctta	cggtaagcgc	2340
atgttcttag	agggagttcc	acttaagatg	tttctcaaga	agataggcag	agctttcgcc	2400
ctctogaatg	agtttgctcc	gtccctcgag	gaagatctgg	ccagagtctg	gagtgccacc	2460
agcgcagcgg	tagagcttga	cctaactccc	tacgtaggat	atgtcctcgg	gtgctgcttg	2520
tctgcgcagc	cgatcagaaa	tcacctcatc	tactccctcg	ttctggaggg	ccctctgctg	2580
gttaaggcct	acgagcgtaa	gttcattaac	tacgacggag	gaacaaagcg	gggggcgatg	2640
ccgggcctac	gtccaacctt	tgagagccta	gtcaaaagta	tctgctggaa	gccaaaggcc	2700
atcgaggagg	ggccgggtatt	gatgttagaa	gatctcatca	tcaaaggggt	ccctgatccg	2760
gcgactagcg	ccctggctca	attgaagtca	atggtgccat	atacctctgg	tatcgaccgg	2820
gagatcatac	tttcctgtct	caaccttccc	ttatcgtcgg	tggatatctc	gtcaatgttg	2880
ttaaaggacc	cggcggccat	caacaccatc	acaaccccg	ccgcggggcg	catcctgcaa	2940
gaggtcgcca	gagactatgt	taccgattac	ccactccaaa	accgcagct	cagagcagtg	3000
gtcaagaacg	tgaagaccga	gctagacaca	ttggccagtg	acttattcaa	atgtgaacct	3060
ttctttcctc	ctttaatgag	cgatatcttc	tggcatctc	tcccggcata	tcaagacagg	3120
attgttcgca	agtgtccac	gacttctaca	atcaggagaa	aagtgccga	gaggggctcc	3180
gactctctcc	tcaaccggat	gaaaaggaat	gagatcaata	agatgatgtt	acatctttgg	3240
gctacctggg	gaaggagccc	tctggccaga	ttagacacca	gatgtctcac	aacctgcacc	3300
aagcaattag	cccaacagta	toggaaccag	tcttggggaa	agcagatcca	tggagtctca	3360
gtcggccacc	ccttagaact	gttcggtcga	ataacacca	gccatagatg	cctacatgag	3420

gaggaccacg gagatttcct gcaaacccttc gccagcgagc atgtgaacca agtggacacc	3480
gacatcacca caactctggg gccgttctac cttacatag gctcggagac gcgagaacgg	3540
gcagtcaagg ttcgaaaagg agtgaattac gtagttgagc cgcttctgaa acccgagtt	3600
cgactactaa gagccattaa ttggttcatt cccgaggagt cagatgcgtc ccatttgctg	3660
agcaatctat tagcgtctgt taccgacatc aatcctcaag accactactc atctaccgaa	3720
gtaggggggg gcaacgcggt ccacgcgtac agctgccgac tatccgacaa attgagcaga	3780
gtcaacaact tatatcagtt gcatacttat ttatctgtca caacagagcg gttgaccaag	3840
tacagtcgag gatcaaaaaa cactgacgca cacttccaga gcatgatgat ttatgcacaa	3900
agccgtcata tagacctcat cttggagtct ctgcacaccg gagagatggt accgttgagg	3960
tgtcatcatc acattgagtg caatcactgt atagaggata taccgcgca gccaatcacg	4020
ggggaccocg cttggactga agtcaagttt ccttcaagtc ctcaggagcc ctttctttac	4080
atcaggcaac aagatctgcc ggtcaaagac aaactcgagc ctgtgcctcg catgaacatc	4140
gtccgtcttg ccggtattggg tccggaggcg attagtgagc tagcgacta ctttgttgca	4200
ttccgagtta tccgggcgtc agagacggat gtgcacctta acgatgttct ctctggacc	4260
tggctgagcc gaattgatcc tgacaaattg gttgagtata tcgtgcatgt gttcgttca	4320
ctggaatggc atcatgtatt aatgtcaggc gtgagtgtga gcgtcagaga tgcattcttt	4380
aagatgctag tgtctaaaag aatctcagag actccgctaa gttcattcta ttatctggcc	4440
aacctgttcg ttgacctca gactcgcgaa gcactaatga gctctaaata cgggttcagc	4500
ccccccgcg agacagtccc caacgcaaatt gccgccgag ccgaaataag aagatgctgt	4560
gcgaacagtg cgcgctgat cttagaatca gcccttcaca gccgtgaggt tgtttgatg	4620
ccaggaaoga acaattatgg agacgttgtc atctggtctc attacattag attacggttc	4680
agcgaagtta aactagttga cattacacga tatcagcagt ggtggagaca gtctgagcga	4740
gacctctacg atttgggtccc ggacatgcag gttcttgaga gcgacctaga tacgctgatg	4800
aaacggatac cgaggctcat gcgcaaggcg agacgtcccc ctcttcagggt aattcgagag	4860
gacctggatg tcgcagtcac caatgctgat catcccgtc actctgtgct tcagaacaaa	4920
tacaggaaat tgattttcag agagccgaag attatcacgg gagctgtgta caagtacctc	4980
tcctaaaaat cagagttgac agagttcacc tcagcaatgg tgatcggaga cggaactgga	5040
ggtatcacccg ccgccatgat ggccgatggg atagatgtgt ggtatcagac gctcgtcaac	5100
tatgaccacg tgacacaaca gggattatcc gtacaagccc cggcagcatt ggatcttctg	5160
cgcggggcac cctctggtag gctcttgaat ccgggaagat tcgcatcatt tgggtctgac	5220
ctaactgacc ctcgattttac agcctacttt gatcaatatc ccccgttcaa ggtggacact	5280
ctatggtctg acgcagaggg cgacttttgg gacaagcctt ccaagttgaa tcaatacttt	5340

ES 2 627 529 T3

gagaacatca ttgctttgag acatcgggtc gtgaagacaa atggacagct tgtcgtgaag	5400
gtgtatctga ctcaagacac tgctaccaca attgaagcat tcagaaagaa gctgtcccca	5460
tgcgccatca tcgtgtctct cttctcgacg gaaggctcca cagaatgctt cgtcctaagc	5520
aatctcatcg caccagacac ccctgtcgac cttgagatgg tggagaatat ccctaaacta	5580
acatcccttg ttccccagag gacgacagtg aaatgctatt cccgacgagt agcgtgcac	5640
agtaaaaggt ggggactttt cagatctccg agcatagccc ttgaagtcca accgttcctt	5700
cactacatca caaaggtcat ctgagacaaa ggaacacaac tgagtctcat ggcggtagct	5760
gacacaatga tcaacagtta caagaaggct atctcaccoc gagtgttcga tctacaccgg	5820
catagggccg cactgggttt cgggaggaga tccttgcac tcactctggg gatgatcatc	5880
tcaccaatcg cttaccagca ttttgagaat ccggccaagt tgatggatgt cctggacatg	5940
ttgaccaata acatctcagc tttcttatcg atatcgtcgt caggatttga cctgtcattt	6000
agtgtcagtg cagaccgaga tgtccggatt gacagcaaac ttgtcagact cccgctattc	6060
gaaggatcag acctaaaatt catgaaaacc atcatgtcta ccctcggatc tgtgttcaac	6120
caggtcgagc cttttaaggg gatcgccata aacccttcta aactaatgac tgtcaagagg	6180
acacaggagt tacgttacia caacctaat tacaactaagg atgccatcct attccccaat	6240
gaagcggcaa aaaacactgc cccgcttoga gccaacatgg tataccccgt ccggggagat	6300
ctattcgccc ctaccgatcg cataccaatc atgactctag tcagcgatga gacaacacct	6360
cagcactctc ctccagagga tgaggca	6387

REIVINDICACIONES

1. Una partícula vírica aislada para su uso en el tratamiento de un cáncer cerebral, teniendo la partícula vírica un genoma que comprende fases abiertas de lectura que codifican:

una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia variante que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 3;
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 4, o una secuencia variante que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 4;
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 5, o una secuencia variante que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 5;
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 6, o una secuencia variante que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 6; y
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7, o una secuencia variante que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 7.

2. La partícula vírica aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que una partícula vírica que tiene una o más secuencias variantes tiene una multiplicidad de infección (MOI) en células cancerosas cerebrales humanas, como se mide usando un ensayo de viabilidad de Alamar Blue, que es igual que la MOI de una partícula vírica sin ninguna secuencia variante.

3. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que al menos una de las fases abiertas de lectura codifica una proteína que tiene una secuencia que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 y 7.

4. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 en la que la variante de una proteína de referencia es una proteína que tiene una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de la proteína de referencia.

5. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el genoma vírico comprende fases abiertas de lectura que codifican:

una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3;
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 4;
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 5;
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 6; y
 una proteína que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7.

6. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además al menos una fase abierta de lectura adicional para codificar al menos una proteína adicional, que es preferentemente una proteína inmunogénica.

7. Una partícula vírica aislada para uso en el tratamiento de un cáncer cerebral, siendo la partícula vírica capaz de producir un polinucleótido de ADNc cuando el virus está en una célula hospedadora, teniendo el polinucleótido de ADNc una secuencia que comprende:

SEQ ID NO: 8, o una secuencia variante conservativa que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 8;
 SEQ ID NO: 9, o una secuencia variante conservativa que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 9;
 SEQ ID NO: 10, o una secuencia variante conservativa que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 10;
 SEQ ID NO: 11, o una secuencia variante conservativa que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 11;
 SEQ ID NO: 12, o una secuencia variante conservativa que es al menos 75 % idéntica a SEQ ID NO: 12; y
 promotores de las mismas.

8. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que una variante conservativa de una secuencia de nucleótidos es una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de referencia de nucleótidos.

9. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 en la que una variante conservativa es una secuencia que comprende una o más sustituciones silenciosas.

10. Una partícula vírica aislada para uso en el tratamiento de un cáncer cerebral, siendo la partícula vírica capaz de producir un polinucleótido de ADNc que comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 cuando el virus está en una célula hospedadora.

11. Una partícula vírica aislada para uso en el tratamiento de un cáncer cerebral, comprendiendo la partícula vírica un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2.

12. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la que el cáncer cerebral es un glioblastoma o un meduloblastoma.
- 5 13. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la que la partícula vírica aislada es administrable al paciente directamente, preferentemente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica, o cualquier combinación de las mismas, siendo preferiblemente la partícula vírica aislada administrable al paciente por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.
- 10 14. La partícula vírica aislada para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que una célula se infecta con la partícula vírica aislada y la célula infectada es administrable al paciente, preferentemente directamente al sistema nervioso central, fuera de la barrera hematoencefálica, dentro de la barrera hematoencefálica o cualquier combinación de las mismas, siendo preferentemente la célula infectada administrable al paciente por vía intratecal, por vía intravenosa o mediante inyección intracraneal.
- 15 15. Un kit para uso en el tratamiento de un cáncer cerebral en un paciente, comprendiendo el kit:
- 20 la partícula vírica aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; e instrucciones para la administración de la partícula vírica aislada al paciente.



Virus Farmington:

- Rabbodivirus aislado de un ave silvestre sana capturada en Connecticut (R. Wallis 1969)

Fig. 1A

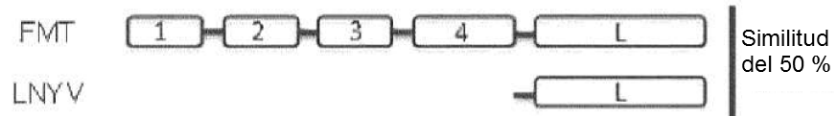


Fig. 1B

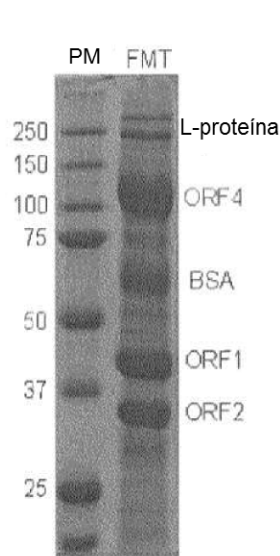


Fig. 1C

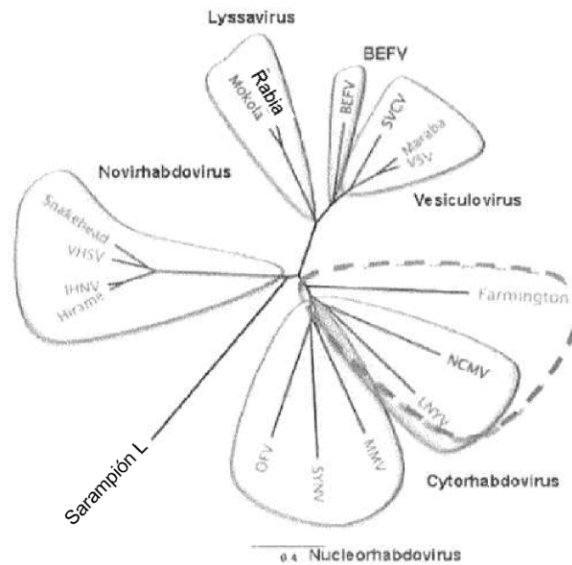


Fig. 1D

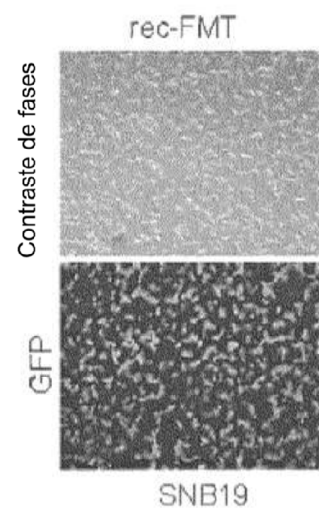


Fig. 1E

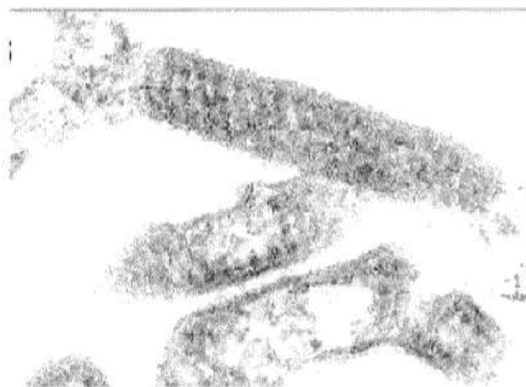


Fig. 1F

Exploración de neurotoxicidad intracraneal para rabdovirus

	^a <i>DL</i> ₅₀	^b <i>DTM</i>
VSV-Δ51	<10 ²	ninguna
Maraba-MG1	<10 ²	ninguna
Carajas	<10 ²	ninguna
Farmington	~10 ⁸	~10 ^{7.5}

Abreviaturas: VSV-Δ51, Virus de la estomatitis vesicular que alberga una supresión de metionina en la proteína M en la posición 51; Maraba-MG1, virus Maraba que alberga una mutación L123W de la proteína M y una mutación Q242R en la proteína G; *DL*₅₀, dosis letal mediana; *DTM*, dosis tolerable máxima.

^a*DL*₅₀ de una única dosis ensayada en ratones BALB/c (hembras de 5-8 semanas de edad) y calculada usando el método de Spearman Karber. ^b*DTM* se indicó como la dosis más alta que no daba como resultado morbilidad duradera.

Fig. 2A

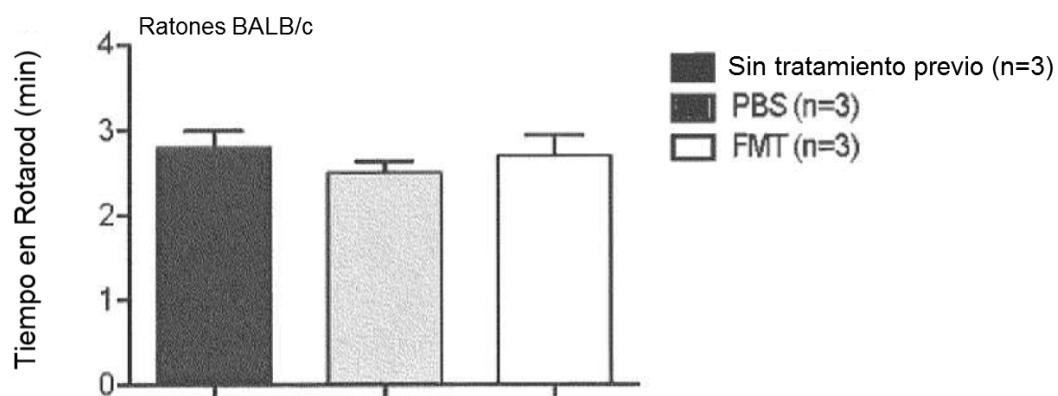


Fig. 2B

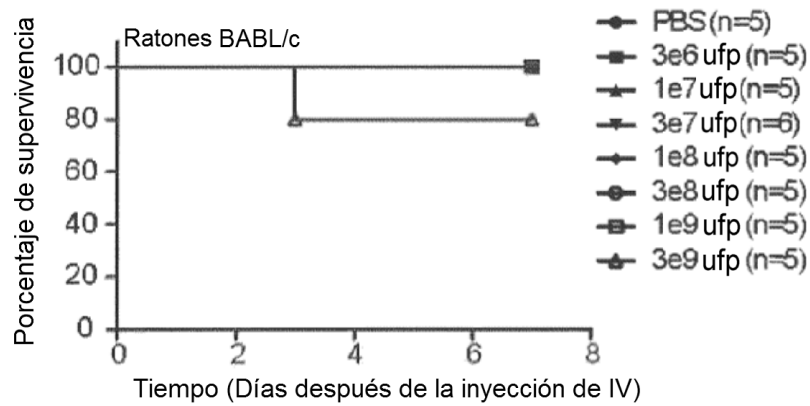


Fig. 2C

<i>ROI</i>	^a 3 meses
Intracraneal	0/10
Intravenosa	0/29

Abreviaturas: FMT, virus Farmington; ROI, vía de administración.

^a indica el número de animales tratados que desarrollaron virus FMT a partir de muestras cerebrales tomadas 3 meses después del tratamiento

Fig. 2D

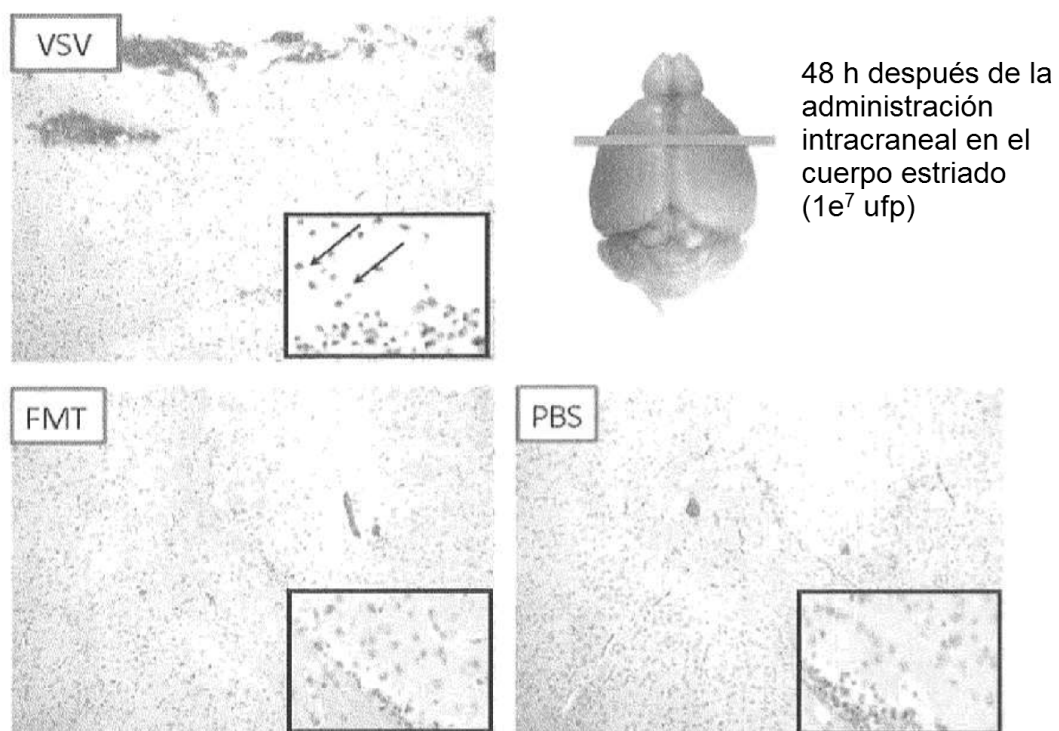


Fig. 2E

El virus Farmington es altamente lítico en líneas celulares derivadas de GBM

	^a CE ₅₀ <0,1 moi
<i>Tumor</i>	
Líneas celulares derivadas de GBM humano (9)	100
Células primarias de pacientes humanos (3)	66
Líneas celulares derivadas de GBM de ratón (3)	66
<i>Normal</i>	
Células normales humanas (2)	0
Células normales de ratón (1)	0

Abreviaturas: GBM, glioblastoma multiforme; CE₅₀, concentración eficaz semi máxima.

^a los valores indican el porcentaje de células dentro de cada clasificación que tuvieron una CE₅₀<0,1 moi. Los valores de CE₅₀ reales para cada línea celular se presentan en la Tabla S2.

Fig. 3A

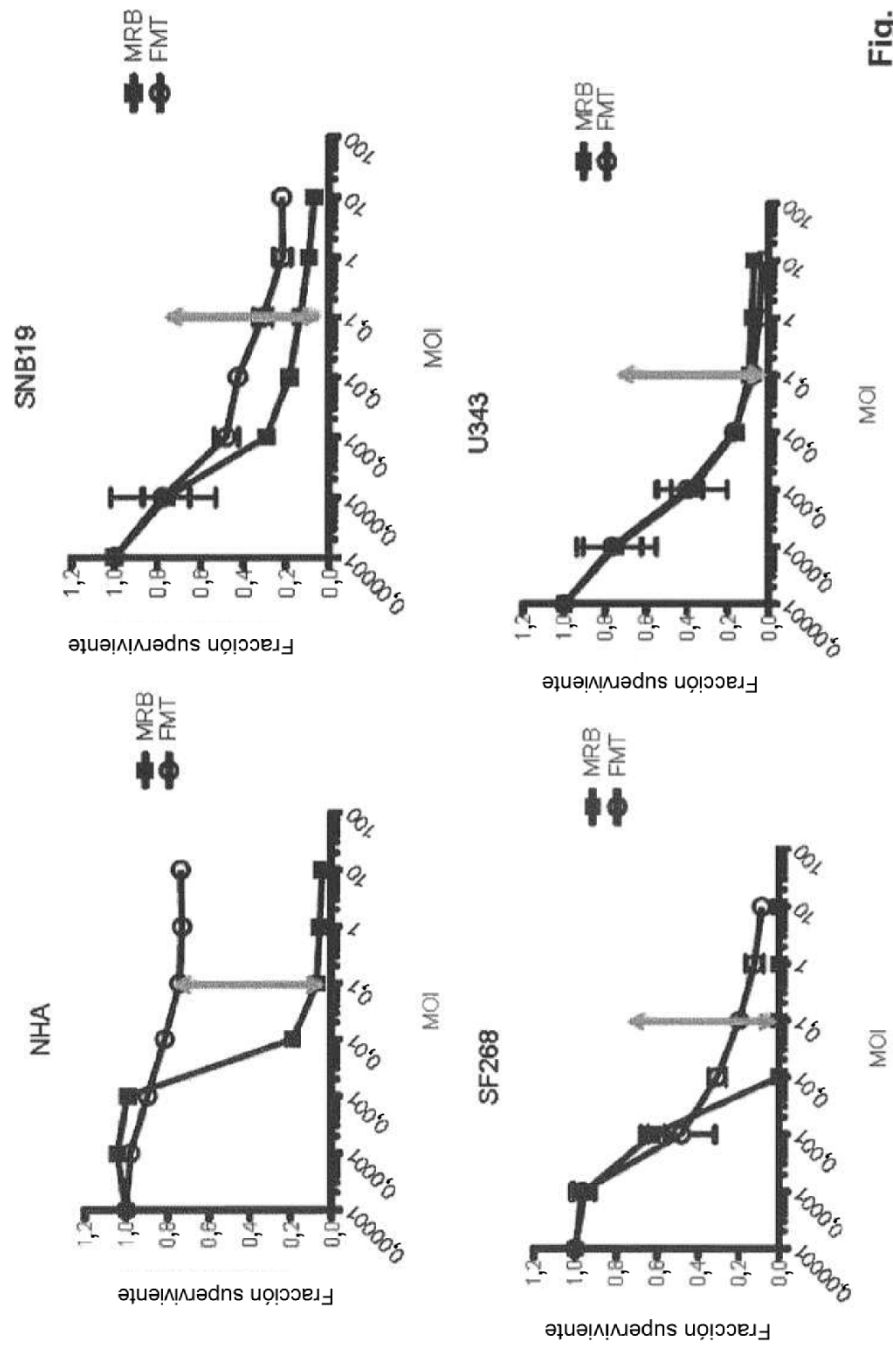


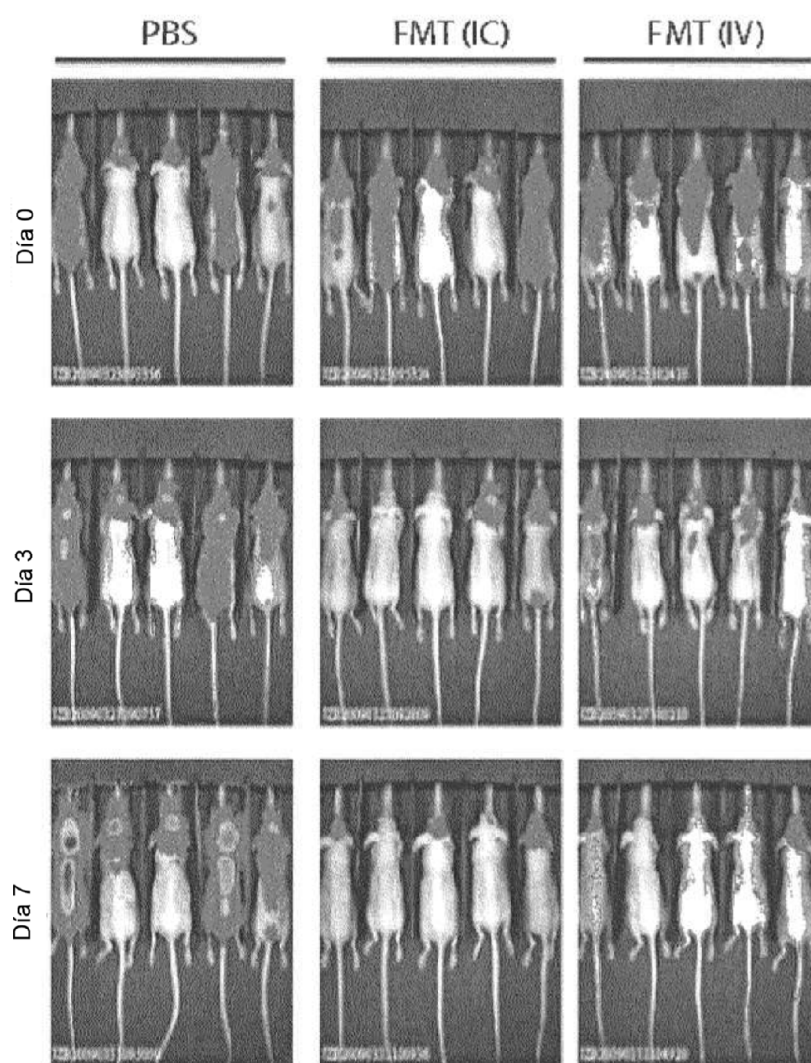
Fig. 3B

El virus Farmington es altamente lítico en líneas celulares derivadas de GBM

	<i>CE₅₀ (moi)</i>
<i>Líneas celulares derivadas de GBM humano</i>	
SF268	Δ,001
U343	Δ,001
U118	Δ,001
SNB19	Δ,001
U87MG	Δ,001
SF265	<0,01
SNB75	<0,01
SF539	<0,1
U373	<0,1
<i>Células primarias de pacientes humanos</i>	
GBM1	Δ,001
GBM2	Δ,001
GBM3	>10
<i>Líneas celulares derivadas de GBM de ratón</i>	
CT-2A	Δ,001
DBT	<0,1
GL261	<10
<i>Células normales humanas</i>	
Fibroblastos cutáneos GM38	1
Astrocito humano normal	>10
<i>Células normales de ratón</i>	
Fibroblastos 3T3	>10

Abreviaturas: GBM, glioblastoma multiforme; CE₅₀, concentración eficaz semi máxima

Fig. 3C



Modelo U-87 MG

Fig. 4A

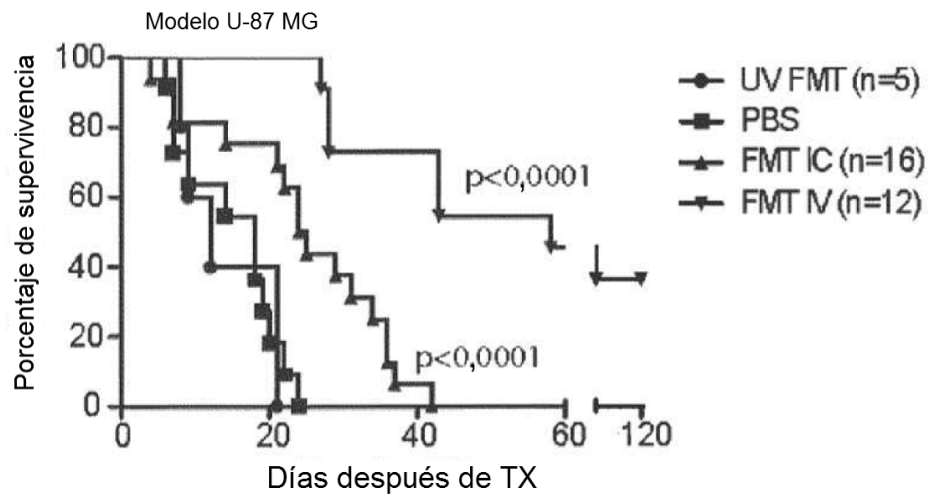


Fig. 4B

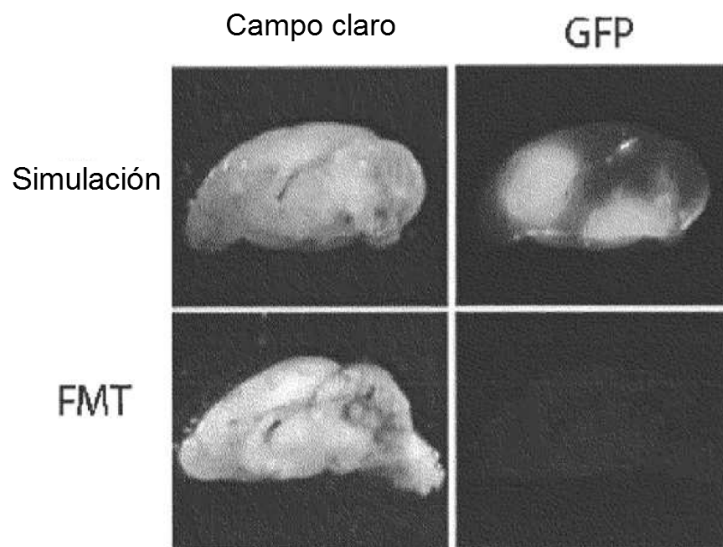


Fig. 4C

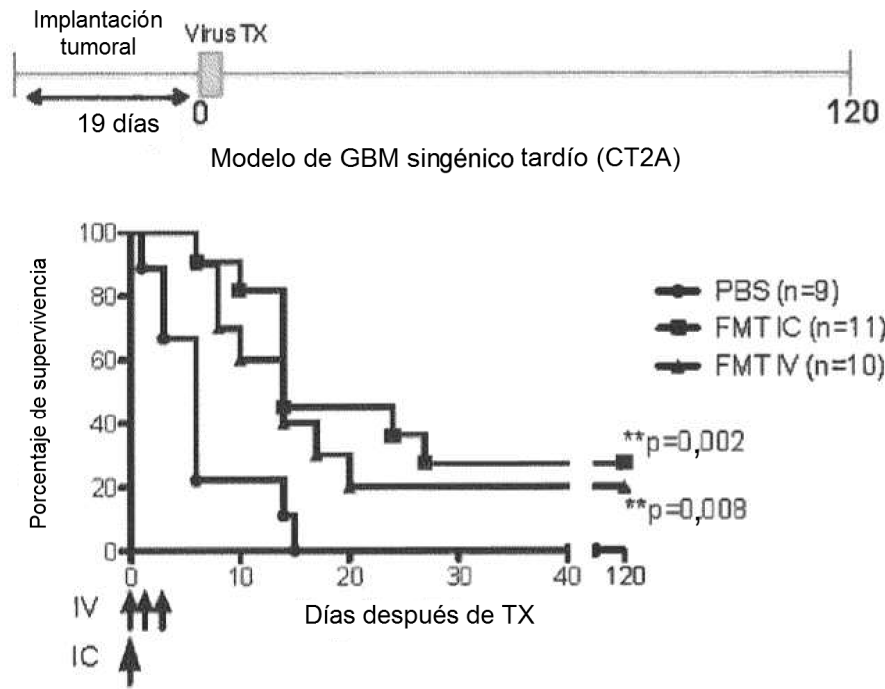
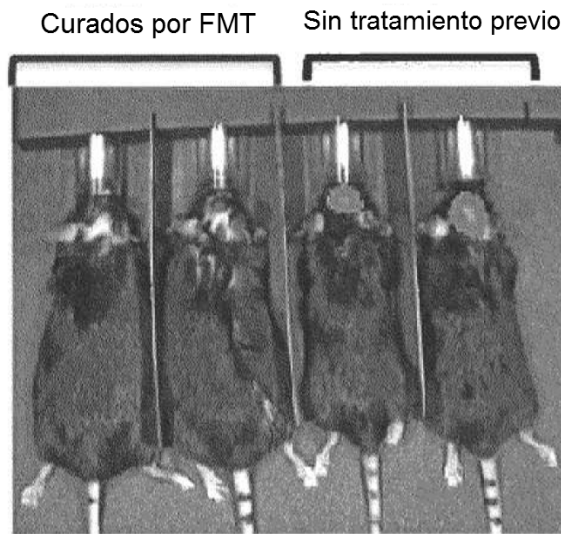


Fig. 4D



Modelo CT-2A

Fig. 5A

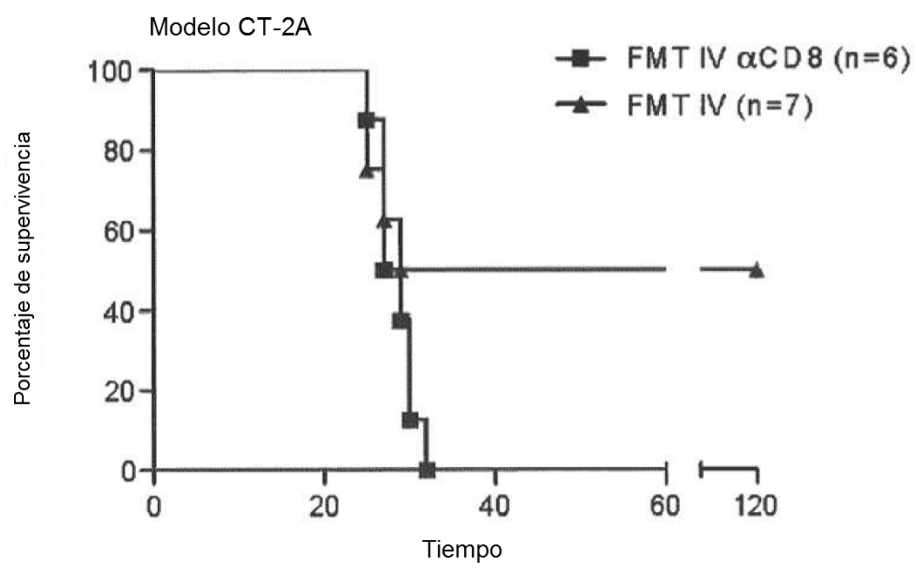


Fig. 5B

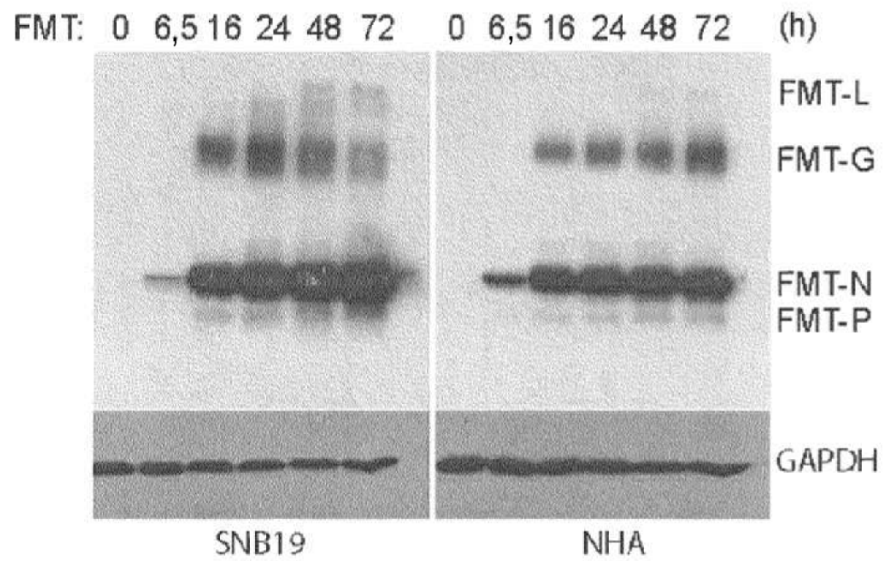


Fig. 6A

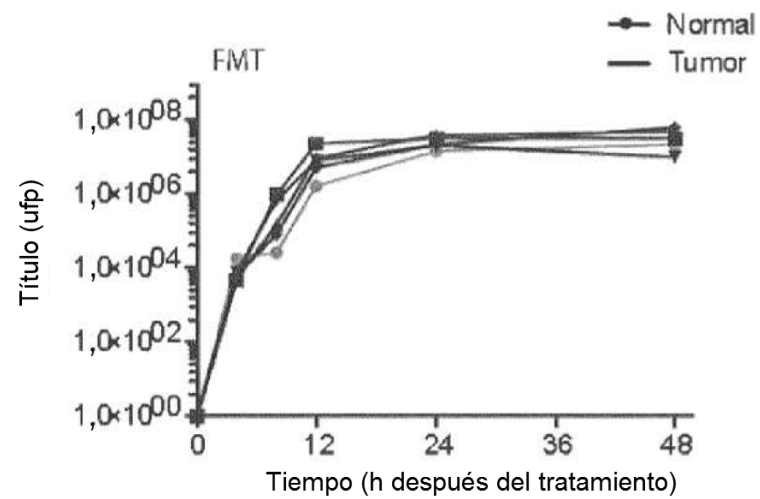


Fig. 6B

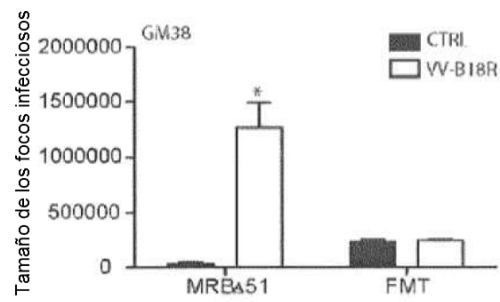
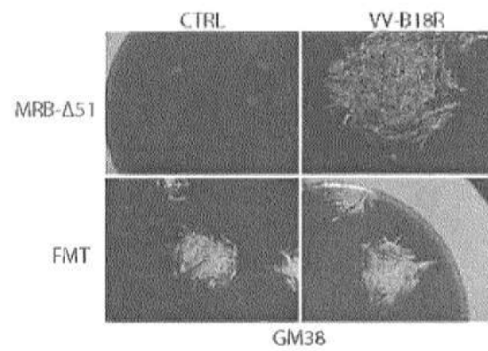


Fig. 6C

Fig. 6D

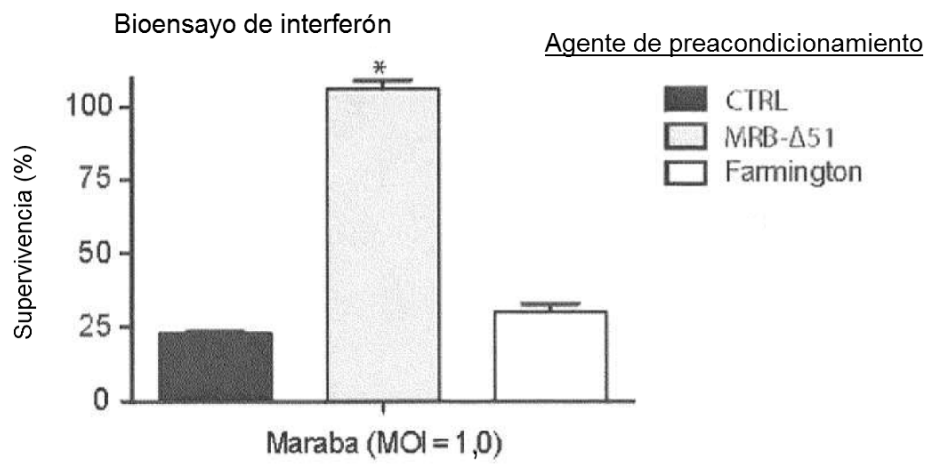


Fig. 6E

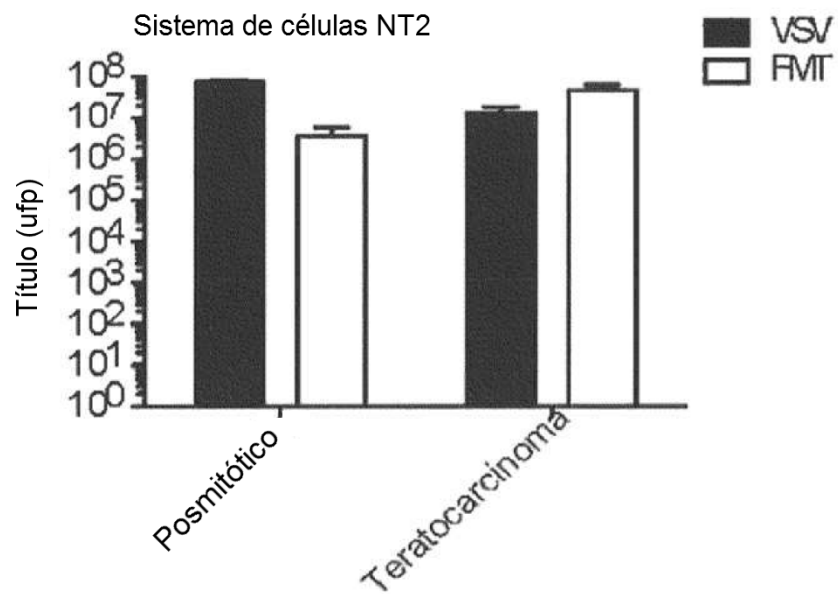


Fig. 7A

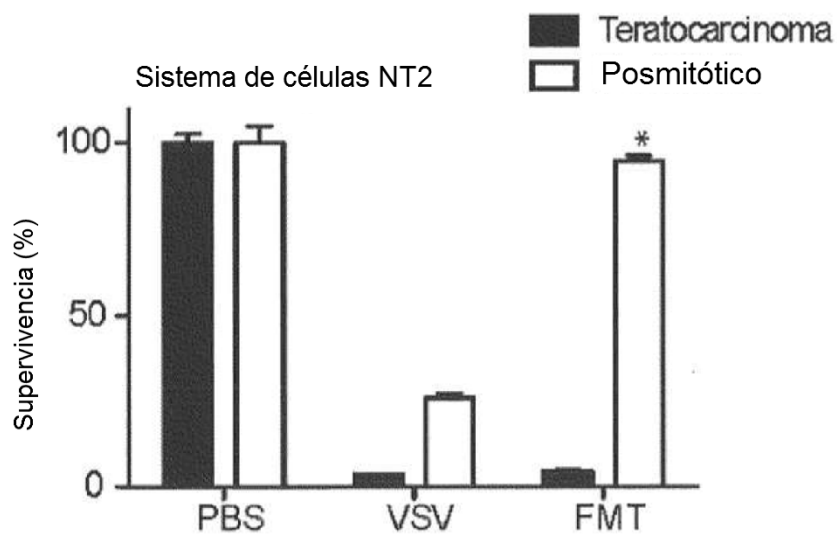


Fig. 7B

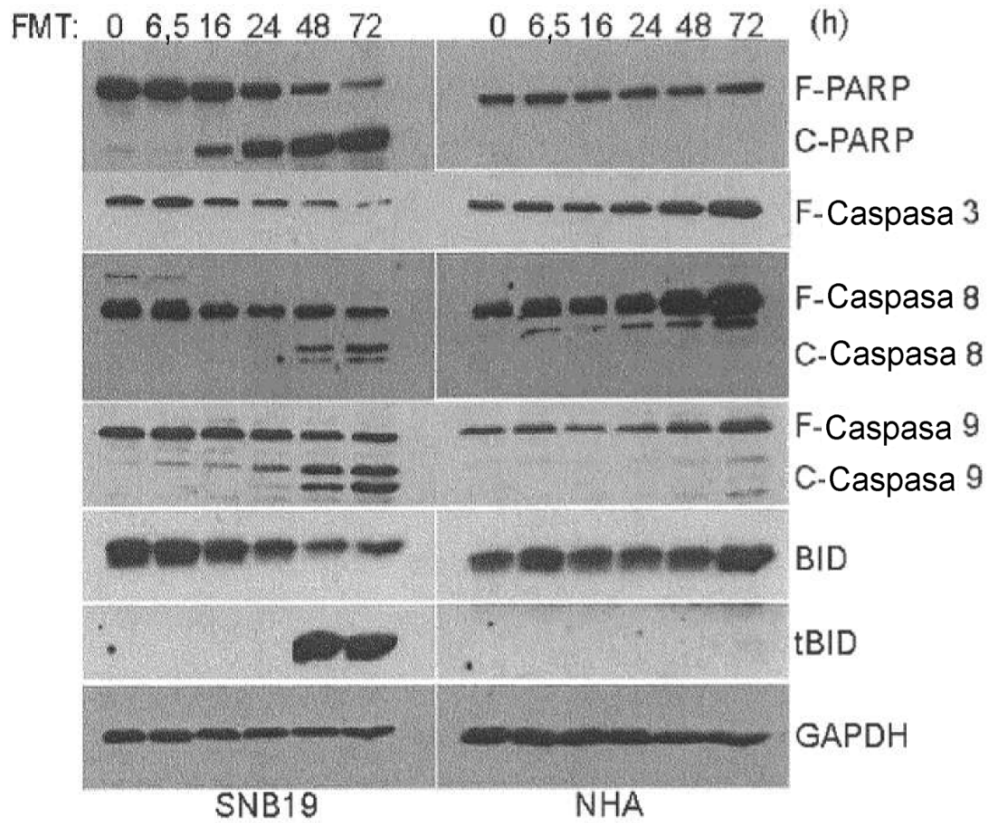


Fig. 7C

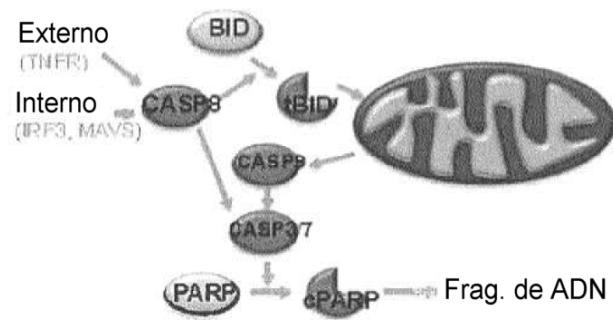


Fig. 7D