(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 741 138**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2007 E 14193656 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2839837**

(54) Título: **Rhabdovirus oncolítico de Farmington**

(30) Prioridad:

15.09.2006 US 844726 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2020

(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:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

Rhabdovirus oncolítico de Farmington

Antecedentes de la invención

I. Campo de la invención

Esta divulgación se refiere en general a la virología y la medicina. En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a virus oncolíticos, particularmente rhabdovirus oncolíticos no VSV y rhabdovirus oncolíticos que comprenden una glicoproteína no de VSV.

II. Antecedentes

Se ha demostrado que varios virus se replican y matan una amplia variedad de células tumorales *in vitro* (virus Sindbis (Unno y col., 2005); virus Sendai (Kinoh y col., 2004); virus Coxackie (Shafren y col., 2004); virus del herpes simple (Mineta y col., 1995); Parvovirus (Abschuetz y col., 2006); Adenovirus (Heise y col., 2000); virus de polio (Gromeier y col., 2000); virus de la enfermedad de Newcastle (Sinkovics y Horvath, 2000); virus de la estomatitis vesicular (Stojdl y col., 2000); virus del sarampión (Grote y col., 2001); Reovirus (Coffey y col., 1998); Retrovirus (Logg y col., 2001); Vaccinia (Timiryasova y col., 1999); y gripe (Bergmann y col., 2001)). Además, se ha demostrado que dichos virus son eficaces en el tratamiento de modelos de cáncer en animales.

Se ha demostrado que el virus de la estomatitis vesicular (VSV), un rhabdovirus bien conocido y bien estudiado destruye las líneas celulares tumorales en experimentos de cultivo celular, y se ha demostrado su eficacia en una variedad de modelos de cáncer en roedores (Stojdl y col., 2000; Stojdl y col., 2003). Sin embargo, el VSV no destruye todas las células cancerosas.

Travassos da Rosa y col. (Emerg Infect Dis. 2002 jun; 8(6):614-618) informaron del aislamiento de dos rhabdovirus. Uno de estos se denominó virus Farmington y se propuso que era un nuevo miembro del género Vesiculovirus. El virus infectaba aves y ratones, así como células renales de mono en cultivo.

Césaire y col. (Oncogene. 2006 Jan 19;25(3):349-358) investigaron la capacidad del VSV para lisar linfocitos T humanos primarios infectados con un virus linfotrópico T tipo 1 (HTLV-1) de pacientes con leucemia de linfocitos T de adulto (ATL). Los autores informaron de que las células ATL primarias *ex vivo* eran permisivas para el VSV y sufrían oncólisis de una manera dependiente del tiempo. La infección por VSV no mostraba replicación vírica ni oncólisis en células no leucémicas infectadas con el HTLV-1 de pacientes con paraparesia espástica tropical/mielopatía asociada a HTLV-1 (HAM/TSP), ni en linfocitos T CD4(+) intactos de individuos normales ni en muestras celulares *ex vivo* de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CCL).

Sumario de la invención

Varios rhabdovirus identificados últimamente son mucho más eficaces en la destrucción de cánceres particulares o líneas celulares de cáncer que el VSV. También el VSV y los mutantes atenuados de VSV son neurovirulentos y producen patología del SNC en roedores y primates. Varios rhabdovirus no infectan el SNC (es decir, el Muir Springs y Bahía Grande: Kerschner y col., 1986), y se ha demostrado un perfil de seguridad más aceptable. Además, las terapias basadas en los nuevos rhabdovirus se pueden utilizar para tratar cánceres del SNC, tanto primarios como secundarios. El rhabdovirus de la divulgación (y/u otros agentes oncolíticos) se pueden utilizar sucesivamente para derivar la respuesta inmunitaria del huésped contra un virus terapéutico particular. Esto permitiría una terapia prolongada y mejora la eficacia.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un rhabdovirus oncolítico Farmington para su uso en medicina humana. Dicho rhabdovirus posee propiedades para destruir células tumorales *in vitro* e *in vivo*.

Como se utiliza en el presente documento, un rhabdovirus no VSV incluirá uno o más de los siguientes virus o variantes de los mismos: virus Arajas, virus Chandipura, virus Cocal, virus Isfahan, virus Maraba, virus Piry, virus Alagoas de la estomatitis vesicular, virus BeAn 157575, virus Boteke, virus Calchaqui, virus Eel Americano, virus Gray Lodge, virus Jurona, virus Klamath, virus Kwatta, virus La Joya, virus Malpais Spring, virus Mount Elgon bat, virus Perinet, virus Tupaia, Farmington, virus Bahia Grande, virus Muir Springs, virus Reed Ranch, virus Hart Park, virus Flanders, virus Kamese, virus Mosqueiro, virus Mossuril, virus Barur, virus Fukuoka, virus Kern Canyon, virus Nkolbisson, virus Le Dantec, virus Keuraliba, virus Connecticut, virus New Minto, virus Sawgrass, virus Chaco, virus Sena Madureira, virus Timbo, virus Almpiwar, virus Aruac, virus Bangoran, virus Bimbo, virus Bivens Arm, virus Blue crab, virus Charleville, virus Coastal Plains, virus DakArK 7292, virus Entamoeba, virus Garba, virus Gossas, virus Humpty Doo, virus Joinjakaka, virus Kannamangalam, virus Kolongo, virus Koolpinyah, virus Kotonkon, virus Landjia, virus Manitoba, virus Marco, virus Nasoule, virus Navarro, virus Ngaingan, virus Oak-Valey, virus Obodhiang, virus Oita, virus Ouango, virus Parry Creek, virus Rio Grande cichlid, virus Sandjimba, virus Sigma, virus Sripur, virus Sweetwater Branch, virus Tibrogargan, virus Xiburema, virus Yata, Rhode Island, virus Adelaide River, virus Berrimah, virus Kimberley, o virus de la fiebre efímera bovina. En ciertos aspectos, rhabdovirus no VSV puede

referirse al supergrupo de Dimarhabdovirus (definidos como rhabdovirus capaces de infectar células tanto de insecto como de mamífero). En aspectos específicos, el rhabdovirus es no VSV. En aspectos particulares el rhabdovirus no VSV es un virus Carajas, virus Maraba, Farmington, virus Muir Springs, y/o virus Bahia grande, incluyendo variantes de los mismos.

Las composiciones para su uso en la invención pueden incluir un segundo virus terapéutico, al como un virus oncolítico. Oncolítico se refiere normalmente a un agente que es capaz de destruir, lisar o detener el crecimiento de una célula cancerosa. En términos de un virus oncolítico el término se refiere a un virus que puede replicarse hasta cierto grado en una célula cancerosa, causan la muerte, lisis o detención del crecimiento de células cancerosas y normalmente tienen efectos tóxicos mínimos sobre las células no cancerosas. Un segundo virus incluye, pero no se limita a un adenovirus, un virus vaccinia, un virus de la enfermedad de Newcastle, un alfavirus, un parvovirus, un herpesvirus, un rhabdovirus no VSV y similares. En otros aspectos, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable. La composición también puede incluir un segundo agente anticáncer, tal como un quimioterápico, radioterápico o inmunoterápico.

El virus oncolítico Farmington para su uso de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en procedimientos que incluyen el tratamiento de un paciente de cáncer, en el que se va a administrar una cantidad eficaz de una composición de virus Farmington al sujeto.

En ciertos aspectos de la divulgación una célula puede estar comprendida en un paciente y puede ser una célula hiperproliferativa, neoplásica, precancerosa, cancerosa, metastática. De acuerdo con la divulgación, un rhabdovirus no VSV para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer se puede administrar a un paciente que tiene una célula susceptible de destruirse por al menos un rhabdovirus no VSV o un régimen o composición terapéuticos que incluyen un rhabdovirus no VSV. La administración de composiciones terapéuticas se puede hacer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más rhabdovirus no VSV o rhabdovirus no VSV recombinante, solo o en distintas combinaciones. La composición que se administra puede tener 10, 100, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, o más partículas víricas o unidades formadoras de placas (ufp). La administración puede ser intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, o administración intranasal. En ciertos aspectos, las composiciones se administran por vía sistémica particularmente por administración intravascular, que incluye la inyección, perfusión y similares. Los procedimientos pueden comprender adicionalmente la administración de una segunda terapia anticáncer, tal como un segundo virus terapéutico. En aspectos particulares un virus terapéutico puede ser un virus oncolítico, más particularmente un rhabdovirus no VSV. En otros aspectos, un segundo agente anticáncer es un quimioterápico, un radioterápico, un inmunoterápico, cirugía o similares.

Otros aspectos de la divulgación se exponen a lo largo de la presente solicitud. Cualquier especto expuesto con respecto a un aspecto de la divulgación también se aplica a otros aspectos de la divulgación, y viceversa.

Los términos “inhibición”, “reducción”, o “prevención” o cualquier variación de estos términos, cuando se utilizan en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva incluye cualquier disminución medible o inhibición completa para conseguir un resultado deseado. Los resultados deseados incluyen, pero no se limitan a paliar, reducir, enlentecer, o erradicación de una afección cancerosa o hiperproliferativa, así como una mejora de la calidad o extensión de la vida.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utilizan en conjunción con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

A lo largo de la presente divulgación, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación típica del error para el dispositivo o procedimiento que se va a emplear para determinar el valor.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se utiliza con el significado de “y/o” a menos de que se indique explícitamente para referirse solo a las alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta una definición que se refiera solamente a alternativa e “y/o”.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras “que comprenden” (y cualquier forma de comprender tal como “comprende” y “comprender”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, tal como “tienen” o “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, tal como “contiene” y “contener”) son inclusivas y de extremos abiertos y no excluye elementos o etapas adicionales no mencionados del procedimiento.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente divulgación se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debería entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican aspectos específicos de la divulgación se dan solo a modo de ilustración.

Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente

ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor en referencia a uno o más de esto dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas que se presenta en el presente documento.

FIG. 1. Relaciones filogenéticas entre los rhabdovirus basada en un alineamiento GDE de una región relativamente conservada de la proteína N (119 aminoácidos), y utilizando el virus paramyxovirus 1 de la para influenza humana (HPIV-1) como el ajeno. El árbol se generó por el procedimiento de unión de vecinos y los valores de arranque (indicados por cada nodo de una rama) se estimaron utilizando 1000 réplicas del árbol. Las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias genéticas. La barra de escala corresponde a sustituciones por sitio de aminoácido cortesía de H. Badrane y P.J. Walker).

FIG. 2. Sumario del ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro*. Las células del panel celular NCI 60 se infectaron durante 96 horas con una serie de diluciones de distintos virus. Se ensayó la viabilidad celular utilizando tinción con cristal violeta para detectar células viables restantes. Se calculó la CE_{50} a partir de las curvas de destrucción celular resultante y se resumen en formato de tabla. Por claridad, los valores de la CE_{50} se habían convertido a un valor de 1-7 como se describe en la leyenda. Además, se ha utilizado el sombreado para indicar el intervalo de CE_{50} a (es decir, de más oscuro a más claro representa los valores de la mayor CE_{50} hasta la menor CE_{50}). Los virus se abreviaron de la siguiente manera: MS = Muir Springs, BG = Bahia Grande, NGG = Ngaingan, TIB = Tibrogargan, FMT = Farmington, MRB = Maraba, CRJ = Carajas, VSVHR = cepa HR del virus de estomatitis vesicular y VV = virus Vaccinia JX-963. Estos datos demuestran que no todos los rhabdovirus son igualmente oncolíticos, de hecho, rhabdovirus estrechamente relacionados se comportan de manera muy diferente sobre las mismas líneas celulares tumorales. Por lo tanto, actualmente no hay un procedimiento para predecir que rhabdovirus tienen un potencial oncolítico. Es necesario el ensayo empírico para identificar los virus que sean buenos candidatos oncolíticos.

FIG. 3A-3B. Productividad de rhabdovirus sobre líneas celulares tumorales. Se infectaron líneas celulares de glioblastoma humano SNB19 y carcinoma de pulmón humano NCI H226 con distintos virus oncolíticos tales como el VSV que comprende una proteína G heteróloga, más particularmente un rhabdovirus no VSV. En otros aspectos, un segundo agente anticáncer es un quimioterápico, un radioterápico, un inmunoterápico, cirugía o similares.

Otros aspectos de la divulgación se exponen a lo largo de la presente solicitud. Cualquier aspecto que se expone con respecto a un aspecto de la divulgación se aplica a otros aspectos de la divulgación también, y viceversa. Los aspectos de las secciones Descripción detallada y Ejemplos se entiende que son aspectos no limitantes de la divulgación que son aplicables a todos los aspectos de la divulgación.

Los términos “inhibición”, “reducción” o “prevención” o cualquier variación de estos términos, cuando se utilizan en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva incluye cualquier disminución o inhibición completa para conseguir un resultado deseado. Los resultados deseados incluyen, pero no se limitan a paliar, reducir, enlentecer, o erradicar una afección cancerosa o hiperproliferativa, así como una mejor calidad o extensión de la vida.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utilizan en conjunción con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

A lo largo de la presente divulgación, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación típica del error para el dispositivo o procedimiento que se va a emplear para determinar el valor.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se utiliza con el significado de “y/o” a menos de que se indique explícitamente para referirse solo a las alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta una definición que se refiera solamente a alternativa e “y/o”.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras “que comprenden” (y cualquier forma de comprender tal como “comprende” y “comprender”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, tal como “tienen” o “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, tal como “contiene” y “contener”) son inclusivas y de extremos abiertos y no excluye elementos o etapas adicionales no mencionados del procedimiento.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente divulgación se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debería entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican aspectos específicos de la divulgación se dan solo a modo de ilustración.

Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor en referencia a uno o más de esto dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas que se presenta en el presente documento.

FIG. 1. Relaciones filogenéticas entre los rhabdovirus basada en un alineamiento GDE de una región relativamente conservada de la proteína N (119 aminoácidos), y utilizando el virus paramyxovirus 1 de la para influenza humana (HPIV-1) como el ajeno. El árbol se generó por el procedimiento de unión de vecinos y los valores de arranque (indicados por cada nodo de una rama) se estimaron utilizando 1000 réplicas del árbol. Las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias genéticas. La barra de escala corresponde a sustituciones por sitio de aminoácido cortesía de H. Badrane y P.J. Walker).

FIG. 2. Sumario del ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro*. Las células del panel celular NCI 60 se infectaron durante 96 horas con una serie de diluciones de distintos virus. Se ensayó la viabilidad celular utilizando tinción con cristal violeta para detectar células viables restantes. Se calculó la CE_{50} a partir de las curvas de destrucción celular resultante y se resumen en formato de tabla. Por claridad, los valores de la CE_{50} se habían convertido a un valor de 1-7 como se describe en la leyenda. Además, se ha utilizado el sombreado para indicar el intervalo de CE_{50} a (es decir, de más oscuro a más claro representa los valores de la mayor CE_{50} hasta la menor CE_{50}). Los virus se abreviaron de la siguiente manera: MS = Muir Springs, BG = Bahia Grande, NGG = Ngaingan, TIB = Tibrogargan, FMT = Farmington, MRB = Maraba, CRJ = Carajas, VSVHR = cepa HR del virus de estomatitis vesicular y VV = virus Vaccinia JX-963. Estos datos demuestran que no todos los rhabdovirus son igualmente oncolíticos, de hecho, rhabdovirus estrechamente relacionados se comportan de manera muy diferente sobre las mismas líneas celulares tumorales. Por lo tanto, actualmente no hay un procedimiento para predecir que rhabdovirus tienen un potencial oncolítico. Es necesario el ensayo empírico para identificar los virus que sean buenos candidatos oncolíticos.

FIG. 3A-3B. Productividad de rhabdovirus sobre líneas celulares tumorales. Se infectaron líneas celulares de glioblastoma humano SNB19 y carcinoma de pulmón humano NCI H226 con distintos rhabdovirus (MOI = 3) y se monitorizaron a lo largo del tiempo en cuanto a la producción de virus mediante el ensayo de placas. Los datos muestran que no todos los rhabdovirus tienen la misma capacidad para replicarse en estas líneas celulares tumorales. Las células NCI H226 revela una gran disparidad de productividad vírica no produciendo nada el virus Bahia Grande mientras que el virus Maraba era capaz de producir copiosos viriones infecciosos.

FIG. 4. Esquema del sistema de rescate para recuperar rhabdovirus recombinantes a partir de una forma de ADN plasmídico. En este ejemplo, el virus Maraba se había clonado en un ADN plasmídico entre el promotor T7 y una secuencia de ribozima del virus de la Hepatitis D. Se infectaron células A549 con virus vaccinia que expresaba T7 y luego posteriormente se transfectaron con un vector de genoma de Maraba modificado para que expresara GFP. Los viriones rescatados se purificaron y se utilizaron entonces para infectar células Vero durante 24 horas, dando como resultado la expresión de GFP en estas células cuando se visualizaban por microscopía de fluorescencia.

FIG. 5. Bioselección de cepas mejoradas de rhabdovirus oncolíticos. Los rhabdovirus son casi una especie. Bahia Grande no es neuropatogénico, pero tiene la capacidad para destruir células de glioblastoma humano. Los inventores contemplaron mejorar su virulencia manteniendo su selectividad por las células cancerosas. Para mejorar la virulencia de un rhabdovirus contra una célula tumoral, los inventores seleccionaron virus mutantes que tuvieran aumentada la capacidad de replicación en una línea celular de glioblastoma humano. En resumen, se infectaron 5×10^5 células SNB19 con $2{,}5 \times 10^6$ partículas víricas, dando una MOI de 5. El inóculo inicial tenía un volumen de 200 µl y se dejó que infectaran durante 1 hora antes de lavarse las células 10 veces con PBS. El último lavado se analizó en cuanto a partículas víricas mediante el ensayo de placas para asegurar una retirada apropiada de los virus introducidos. En puntos de tiempo crecientes se recolectó el sobrenadante completo y se remplazó con medio reciente. El medio recolectado se utilizó para infectar nuevas células para la amplificación y se analizaron por el ensayo de placas en cuanto a la presencia de partículas víricas. Para el primer pasaje, las recolecciones se hicieron a las 4, 8, 12 y 24 hpi (horas post infección) hasta el momento inicial en que se determinó la liberación vírica. Los virus de los puntos de tiempo más tempranos se amplificaron hasta una población de 10^6 y entonces se volvieron a pasar.

FIG. 6. Bioselección de cepas mejoradas de rhabdovirus oncolíticos. En este ejemplo, el virus de Bahia Grande se sometió a hasta 6 ciclos repetidos de bioselección. La cepa parental (WT) junto con los pasajes 4-6 se monitorizaron en cuanto a la producción de virus en las células SNB19 a las 4, 6 y 8 horas post infección. Una mejora clara y progresiva de la velocidad de replicación inicial de virus era evidente durante las rondas crecientes de bioselección. MRB = Maraba se incluye como un ejemplo de la replicación vírica rápida y deseable en la línea celular cancerosa.

FIG. 7. El Bahia Grande P13 se sometió a 13 rondas de bioselección. Este virus demostró una replicación vírica mejorada no solo en el glioblastoma humano utilizado durante el protocolo de bioselección, sino en un glioblastoma humano no relacionado y en una línea celular de carcinoma ovárico humano. Esto demuestra que los rhabdovirus pueden bioseleccionarse para mejorar sus propiedades oncolíticas y estas mejoras son eficaces en otros cánceres diferentes.

FIG. 8. Se infectaron por vía intracraneal ratones Balb/c con los virus indicados y se monitorizaron en cuanto a la morbilidad y/o mortalidad. Tanto el VSV de tipo silvestre (cepa HR) como la cepa mutante delta M512 de VSV eran extremadamente neurotóxicos, demostrando parálisis de extremidades posteriores dentro de días de la

infección, mientras que los virus Bahía Grande y Muir Springs no presentaban neurotoxicidad. Bahía Grande P6 es una cepa bioseleccionada de Bahía Grande con una replicación mejorada en células de glioblastoma humano. Esta cepa tampoco presentaba neurotoxicidad, demostrando que los rhabdovirus se pueden bioseleccionar para mejorar la virulencia en células tumorales mientras mantienen su perfil de seguridad en el tejido sano normal.

FIG. 9. Eficacia *in vivo* de los rhabdovirus Maraba y Carajas en comparación con Chandipura y WT VSV y delata 51 VSV. Se establecieron tumores 4T1 (que expresan luciferasa de luciérnaga) en ratones hembra Balb/C de 5-8 semanas de edad inyectando 10^6 células tumorales en la glándula mamaria posterior izquierda. Después de una semana, se inyectó a los ratones los días 1 y 2 (cada dosis = 10^7 ufp de WT VSV, Δ51 GFP VSV, Maraba o Chandipura; o 10^8 ufp de Carajas). Las respuestas tumorales se midieron por creación de imágenes de bioluminiscencia utilizando un IVIS 200 (Xenogen) (medida en fotones/s/cm^2).

FIG. 10. Infectividad de VSV G-menos pseudotipado con proteína G de Isfahan y G de VSV.

FIG. 11. Una curva de crecimiento en una etapa de los virus VSV WT, Isfahan y RVR IsfG1.

FIG. 12. El RVR que comprende una proteína G de Isfahan se mantiene oncolítico. Se evaluaron las citotoxicidades del virus Isfahan, VSV d51 y RVR IsfG1 sobre distintas líneas celulares.

FIG. 13A-13C. El RVR que comprende Isf G1 es un virus capaz de escapar a la respuesta inmunitaria contra VSV *in vivo*. Se utilizó la detección de luciferasa *in vivo* para determinar la cantidad de virus en los ratones inoculados con RVR IsfG1 o VSV. La **FIG. 13A**, es la detección *in vivo* de virus recombinante inyectado en ratones intactos. La **FIG. 13B**, es la detección *in vivo* de VSV inyectado en ratones inmunizados con VSV. La **FIG 13C**, es la detección *in vivo* del virus RVR IsfG1 recombinante inyectado en ratones inmunizados con VSV.

FIG. 14. Rendimientos de virus de tumores infectados. Se infectaron tumores con virus recombinante o VSV en presencia o ausencia de inmunización con VSV (como se indica) los datos en los gráficos muestran la cantidad de virus que resulta de la infección del tumor.

FIG. 15. Una curva de crecimiento en una etapa de VSV WT, virus Chandipura y $RVR_{cha}G^1$. Los resultados muestran que el recombinante produce la misma cantidad de virus que el VSV.

FIG. 16. Citotoxicidad de VSV WT, virus Chandipura y $RVR_{cha}G^1$. Los resultados muestran que recombinante es tan citotóxico como el VSV.

FIG. 17. Una curva de crecimiento en una etapa de VSV WT, virus Maraba y $RVR_{Mar}G^1$. Los resultados muestran que el título de virus recombinante era mayor que el de VSV a las 48 y 72 h.

FIG. 18. Citotoxicidad de VSV WT, virus Maraba y $RVR_{Mar}G^1$. Los resultados muestran que tanto el maraba como el $RVR_{Mar}G^1$. Son citotóxicos en líneas celulares tumorales y son en general más citotóxicos para las células tumorales que el VSV WT.

Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la divulgación se basan en la destrucción por un rhabdovirus no VSV o rhabdovirus pseudotipado de varias clases o tipos de células cancerosas, que son resistentes a la destrucción por VSV. Algunas de las ventajas de estos rhabdovirus oncolíticos y rhabdovirus recombinantes incluyen las siguientes: (1) Son raros los anticuerpos contra los rhabdovirus inventivos o no existen en la mayoría de las poblaciones del mundo. (2) los rhabdovirus se replican más rápidamente que otros virus oncolíticos tales como adenovirus, reovirus, sarampión, parvovirus, retrovirus y VSH. (3) Los rhabdovirus crecen con altos títulos y se pueden filtrar a través de un filtro de 0,2 micrómetros. (4) Los rhabdovirus oncolíticos y los recombinantes de los mismos tienen un intervalo de huéspedes amplio, capaz de infectar muchos tipos diferentes de células cancerosas y no están limitados por receptores sobre una célula particular (por ejemplo, como el coxsackie, sarampión, adenovirus). (5) El rhabdovirus de la invención se presta a modificación genética. (6) El rhabdovirus también tiene un ciclo de vida citoplásmica y no se integra en el material genético de una célula huésped, lo que da lugar a un perfil de seguridad más favorable.

I. Familia *Rhabdoviridae* (Rhabdovirus)

Los rhabdovirus arquetipo son los virus de la rabia y la estomatitis vesiculosa (VSV), el más estudiado de esta familia de virus. Aunque estos virus comparten morfologías similares, son muy diferentes en su ciclo vital, intervalo de huéspedes y patología. Rhabdoviridae es una familia de virus con forma de bala que tienen genomas de ARN en sentido (-) no segmentados. Hay más de 250 rhabdovirus conocidos por infectar mamíferos, peces, insectos y plantas. La familia se divide en al menos 5 géneros: (1) Lyssavirus: incluyendo el virus de la rabia, otros virus de mamífero, algunos virus de insecto; (2) Vesiculovirus: que incluyen el virus de la estomatitis vesicular (VSV); (3) Ephemerovirus: que incluyen el virus de la fiebre efímera bovina (vertebrados); (4) Citorhabdovirus: que incluye el virus amarillo necrótico de la lechuga (plantas); y (5) Nucleorhabdovirus: que incluyen el virus enano amarillo de la patata (plantas). También se ha sugerido que existe un supergrupo de rhabdovirus denominado Dimarthabdovirus que incluye una variedad de rhabdovirus que infecta tanto mamíferos como insectos.

La familia Rhabdoviridae incluye, pero no se limitan a: virus Arajas, virus Chandipura, (AF128868 / gi:4583436, AJ810083 / gi:57833891, AY871800 / gi:62861470, AY871799 / gi:62861468, AY871798 / gi:62861466, AY871797 / gi:62861464, AY871796 / gi:62861462, AY871795 / gi:62861460, AY871794 / gi:62861459, AY871793 / gi:62861457, AY871792 / gi:62861455, AY871791 / gi:62861453), virus Cocal (AF045556 / gi:2865658), Isfahan virus (AJ810084 / gi:57834038), virus Maraba (SEQ ID NO:1-6), virus Carajas (SEQ ID NO:7-12, AY335185 / gi:33578037), virus Piry (D26175 / gi:442480, Z15093 / gi:61405), virus de estomatitis vesicular Alagoas, virus BeAn 157575, virus Boteke, virus Calchaqui, virus Eel American, virus Gray Lodge, virus Jurona, virus Klamath, virus Kwatta, virus La Joya, virus Malpais Spring, virus Mount Elgon bat (DQ457103 / gi:91984805), virus Perinet (AY854652 / gi:71842381), virus Tupaia (NC_007020/ gi:66508427), Farmington, virus Bahia Grande (SEQ ID NO:13-18), virus Muir Springs, virus Reed Ranch, virus Hart Park, virus Flanders (AF523199 / gi:25140635, AF523197 / gi:25140634, AF523196 / gi:25140633, AF523195 / gi:25140632, AF523194 / gi:25140631, AH012179 / gi:25140630), virus Kamese, virus Mosqueiro, virus Mossuril, virus Barur, virus Fukuoka (AY854651 / gi:71842379), virus Kern Canyon, virus Nkolbisson, virus Le Dantec (AY854650 / gi:71842377), virus Keuraliba, virus Connecticut, virus New Minto, virus Sawgrass, virus Chaco, virus Sena Madureira, virus Timbo, virus Almpiwar (AY854645 / gi:71842367), virus Aruac, virus Bangoran, virus Bimbo, virus Bivens Arm, virus Blue crab, virus Charleville, virus Coastal Plains, virus DakArK 7292, virus Entamoeba, virus Garba, virus Gossas, virus Humpty Doo (AY854643 / gi:71842363), virus Joinjakaka, virus Kannamangalam, virus Kolongo (DQ457100 / gi:91984799 nucleoprotein (N) mRNA, partial cds); virus Koolpinyah, virus Kotonkon (DQ457099 / gi:91984797, AY854638 / gi:71842354); virus Landjia, virus Manitoba, virus Marco, virus Nasoule, virus Navarro, virus Ngaingan (AY854649 / gi:71842375), virus Oak-Vale (AY854670 / gi:71842417), virus Obodhiang (DQ457098 / gi:91984795), virus Oita (AB116386 / gi:46020027), virus Ouango, virus Parry Creek (AY854647 / gi:71842371), virus Rio Grande cichlid, virus Sandjimba (DQ457102 / gi:91984803), Sigma virus (AH004209 / gi:1680545, AH004208 / gi:1680544, AH004206 / gi:1680542), virus Sripur, virus Sweetwater Branch, virus Tibrogargan (AY854646 / gi:71842369), virus Xiburema, virus Yata, Rhode Island, virus Adelaide River (U10363 / gi:600151, AF234998 / gi:10443747, AF234534 / gi:9971785, AY854635 / gi:71842348), virus Berrimah (AY854636 / gi:71842350]), virus Kimberley (AY854637 / gi:71842352), o de la fiebre efímera bovina (NC_002526 / gi:10086561).

Ciertos serotipos sin asignar incluyen (1) el grupo Bahía Grande (virus Bahía Grande (BGV), virus Muir Springs (MSV), virus Reed Ranch (RRV); (2) virus del grupo Hart Park (Flanders virus (FLAV), virus Hart Park (HPV), virus Kamese (KAMV), virus Mosqueiro (MQOV), virus Mossuril (MOSV); (3) grupo del virus Kern Canyon (virus Barur (BARV), virus Fukuoka (FUKAV), virus Kern Canyon (KCV), virus Nkolbisson (NKOV); (4) Grupo Le Dantec (virus Le Dantec (LDV), virus Keuraliba (KEUV), (5) grupo Sawgrass (virus Connecticut (CNTV), virus New Minto (NMV), virus Sawgrass (SAWV); (6) Grupo Timbo (virus Chaco (CHOV), virus Sena Madureira (SMV), virus Timbo (TIMV); y (7) otros virus sin asignar (virus Almpiwar (ALMV), virus Aruac (ARUV), virus Bangoran (BGNV), virus Bimbo (BBOV), virus Bivens Arm (BAV), virus Blue crab (BCV), virus Charleville (CHVV), virus Coastal Plains (CPV), virus DakArK 7292 (DAKV-7292), virus Entamoeba (ENTV), virus Garba (GARV), virus Gossas (GOSV), virus Humpty Doo (HDOOV), Joinjakaka virus (JOIV), Kannamangalam virus (KANV), Kolongo virus (KOLV), Koolpinyah virus (KOOLV), virus Kotonkon (KOTV), virus Landjia (LJAV), virus Manitoba (MNTBV), virus Marco (MCOV), Ngaingan, virus Nasoule (NASV), virus Navarro (NAVV), virus Ngaingan (NGAV), virus Oak-Vale (OVRV), virus Obodhiang (OBOV), virus Oita (OITAV), virus Ouango (OUAV), virus Parry Creek (PCRV), virus Rio Grande cichlid (RGRCV), virus Sandjimba (SJAV), virus Sigma [X91062] (SIGMAV), virus Sripur (SRIV), virus Sweetwater Branch (SWBV), virus Tibrogargan (TIBV), virus Xiburema (XIBV), virus Yata (YATAV).

Los aspectos de la divulgación pueden incluir, pero no se limita a rhabdovirus no VSV seleccionados o rhabdovirus pseudotipados basados en su crecimiento en líneas celulares, falta de o una mínima toxicidad en ratones adultos (animales), falta o mínima toxicidad en ratones lactantes (animales).

A. Genoma rhabdovírico

Normalmente el genoma del rhabdovirus tiene aproximadamente de 11-15 kb con un líder 3' de 50 nucleótidos y una región no traducida 5' de aproximadamente 60 nucleótidos de un ARN vírico en sentido (-) (vARN). Normalmente, el vARN del rhabdovirus tiene 5 genes que codifican 5 proteínas. Los rhabdovirus tienen una señal de poliadenilación conservada al final de cada gen y una corta región intergénica entre cada uno de los 5 genes. Todos los rhabdovirus contienen 5 genes que codifican la proteína de la nucleocápside (N), Fosfoproteína (P, también denominada NS), proteína de la matriz (M), glicoproteína (G), y proteína grande (L). Normalmente, estos genes se ordenan en el vARN en sentido negativo de la siguiente manera: 3'-N-P-M-G-(X)-L-5'. El orden de los genes es importante ya que dicta la proporción de proteínas sintetizadas. Cualquier modificación del genoma de un rhabdovirus incluye normalmente al menos cinco dominios de transcripción para mantener la capacidad de infectar y replicarse a altos niveles. Los rhabdovirus tiene una ARN polimerasa para la transcripción de más ARNm en sentido. El gen X no existe en todos los rhabdovirus. El gen X codifica una proteína no estructural que se encuentra en el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa de los peces (DQ164103 / gi:76262981; DQ164102 / gi:76262979; DQ164101 / gi:76262977; DQ164100 / gi:76262975; DQ164099 / gi:76262973; AB250935 / gi:112821165; AB250934 / gi:112821163; AB250933 / gi:112821161; AB250932 / gi:112821159; AB250931 / gi:112821157; AB250930 / gi:112821155; AB250929 / gi:112821153; AB250928 / gi:112821151; AB250927 / gi:112821149, que describen la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína G), una glicoproteína no estructural del virus de la fiebre efímera bovina y un pseudogén en el virus de rabia. El gen extra (X) se ha encontrado en diferentes localizaciones del genoma de rhabdovirus. Las síntesis de proteína M en las células infectadas es citopático para la célula, y

eventualmente da como resultado la muerte celular.

La transmisión del rhabdovirus varía dependiendo del virus/huésped, pero la mayoría se transmite por contacto directo – por ejemplo, la transmisión de rabia por mordedura de un animal o un insecto vector. Existe un periodo de incubación largo *in vivo*, pero esto no se refleja en la cinética de replicación vírica en cultivo. Las espículas de la proteína G se unen a los receptores en la superficie de las células huésped y los virus entran en la célula por endocitosis y se fusionan con la membrana de la vesícula con la mediación de la proteína G.

Sin intentar quedar limitados por una teoría en particular, se cree que las moléculas del receptor para los rhabdovirus son fosfolípidos más que proteínas específicas. La replicación rhabdovírica se produce en el citoplasma – tanto la proteína L y NS son necesarias para la transcripción – no funcionan solas. Se producen cinco ARNm monocistrónicos, protegidos en el extremo 50 y poliadenilados en el extremo 30 y cada uno contiene la secuencia líder desde el extremo 3' del vARN en el extremo 50 del mensaje. Estos ARNm se producen por transcripción secuencial de las ORF en el genoma vírico y no se ha demostrado que la secuencia intergénica sea responsable de la terminación y reinicio de la transcripción por la polimerasa entre cada gen, produciéndose así transcripciones diferentes.

El vARN de la progenie se produce a partir de un intermediario en sentido (+). El genoma se replica por el complejo polimerasa L + P (como en la transcripción), pero también son necesarios factores de la célula del huésped adicionales. Es característico de los rhabdovirus que estos eventos se produzcan en una parte del citoplasma que actúa como una 'fábrica' de virus y aparece como un cuerpo de inclusión citoplásmico característico.

B. Variantes de proteínas víricas

En ciertos aspectos, un rhabdovirus o rhabdovirus no VSV comprenderá una variante de una o más de las proteínas N, P, M, G y/o L. En ciertos aspectos de la divulgación estas variantes de proteínas víricas pueden estar comprendidas en una composición proteinácea que se definen adicionalmente con posterioridad. Las composiciones proteináceas incluyen partículas víricas y otras composiciones que tienen uno o más componentes proteicos víricos. Estas variantes de polipéptido se pueden modificar o seleccionar para una modificación en una o más características fisiológicas o biológicas, tal como intervalo de células huésped, especificidad de células huésped, toxicidad para las células u órganos no diana, replicación, citotoxicidad para una célula diana, destrucción de células cancerosas, éstasis de células cancerosas, infectividad, parámetros de fabricación, tamaño de partícula vírica, estabilidad de las partículas víricas, aclaramiento *in vivo*, inmunorreactividad, y similares. Estas variantes polipeptídicas se pueden modificar utilizando una variedad de metodologías conocidas en la técnica, incluyendo distintas técnicas de mutagénesis descritas posteriormente.

C. Rhabdovirus recombinantes

Los rhabdovirus recombinantes se pueden producir (1) completamente utilizando ADNc o (2) con una combinación de ADNc transfectados en una célula auxiliar, o (3) con ADNc transfectados en una célula que se infectan adicionalmente con un rhabdovirus recombinante infeccioso o no infeccioso. Utilizando cualquiera de estos procedimientos (por ejemplo, minivirus, línea celular auxiliar, o transfección solo de ADNc), los componentes mínimos necesarios son una molécula de ARN que contenga las señales cis-actuantes para (1) la encapsidación del ARN genómico (o antigenómico) por la proteína N del rhabdovirus, y (2) la replicación de un equivalente de ARN genómico o antigenómico (intermediario replicante).

Por elemento replicante o replicón, los inventores quieren decir una cadena de ARN que contenga mínimamente en los extremos 5' y 3' la secuencia líder y la secuencia remolque de un rhabdovirus. En el sentido genómico el líder está en el extremo 3' y el remolque está en el extremo 5'. Cualquier ARN situado entre estas dos señales de replicación ser replicará a su vez. Las regiones líder y remolque deben contener adicionalmente los elementos cis-actuantes mínimos con fines de encapsidación por la proteína N y para la unión de la polimerasa que son necesarios para iniciar la transcripción y replicación.

Para la preparación de rhabdovirus modificados uno minivirus que contenga el gen G también contendría una región líder y una región remolque y un gen G con las señales apropiadas de inicio y terminación para la producción de un ARNm de proteína G. Si el minivirus comprende adicionalmente un gen M, deben estar presentes también las señales apropiadas de inicio y terminación para la producción del ARNm de la proteína M.

Para cualquier gen contenido dentro del genoma modificado del rhabdovirus, el gen estaría flanqueado por las señales apropiadas de inicio y terminación de la transcripción, que es un gen que normalmente no se codifica por un rhabdovirus aislados de la naturaleza o que contiene la región codificante de rhabdovirus en una posición, forma o contexto que normalmente no se encuentra, por ejemplo, una proteína G quimérica.

Para producir rhabdovirus modificados "no-infecciosos", el rhabdovirus modificado puede tener elementos mínimos de replicón y las proteínas N, P y L y debe contener el gen M (un ejemplo es la construcción ΔG o G-menos, que ha perdido la región codificante de la proteína G). Esto produce partículas víricas que brotan de la célula pero que son partículas no infecciosas. Para producir partículas "infecciosas", las partículas víricas deben comprender adicionalmente proteínas que puedan mediar la unión de la partícula vírica y la fusión, tal como mediante el uso de

una proteína de enganche o ligando de receptor. El ligando de receptor nativo de rhabdovirus es la proteína G.

Una “célula adecuada” o “célula huésped” significa cualquier célula que permita la unión del rhabdovirus recombinante.

Par preparar partículas víricas infecciosas, se infecta primero una línea celular apropiada (por ejemplo, células BHK) con virus vaccinia VTF7-3 (Fuerst y col., 1986) o un equivalente que codifica la ARN polimerasa T7 u otras polimerasas de bacteriófago adecuada tal como las polimerasas T3 o SP6 (véase Usdin y col., 1993 o Rodríguez y col., 1990). Las células se transfectan entonces con ADNc individuales que contienen los genes que codifican las proteínas G, N, P y L de rhabdovirus. Estos ADNc proporcionarán las proteínas para construir una partícula de rhabdovirus recombinante. Las células se pueden transfectar por cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, liposomas, electroporación, etc.).

También se transfectan en una línea celular un “ADNc policistrónico” que contenga el equivalente de ARN genómico de rhabdovirus. Si se pretende que la partícula de rhabdovirus recombinante infecciosa sea lítica en la célula infectada, entonces los genes que codifican las proteínas N, P, M y L deben estar presentes, así como cualquier segmento de ácido nucleico heterólogo. Si no se pretende que la partícula de rhabdovirus recombinante infecciosa sea lítica, entonces el gen que codifica la proteína M n ose incluye en el ADN policistrónico- Por “ADNc policistrónico” se quiere decir un ADNc que comprende al menos unidades de transcripción que contengan los genes que codifican las proteínas N, P y L. El ADN policistrónico de rhabdovirus recombinante puede contener también un gen que codifique una variante de proteína o fragmento polipeptídico de la misma, o un ácido nucleico terapéutico. De manera alternativa, cualquier proteína asociada inicialmente con la particular vírica producida primero o fragmento de la misma se puede suministrar en trans.

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

La primera etapa en la generación de un rhabdovirus recombinante es la expresión de un ARN que es un equivalente genómico o antigenómico de un ADNc. Luego ese ARN se empaqueta en la proteína N y luego se replica mediante las proteínas p/l. El virus así producido se puede recuperar. Si la proteína G está ausente del ARN genómico recombinante, normalmente se suministra en trans. Si están ausentes las proteínas G y M, entonces ambas se suministran en trans.

Para la preparación de partículas de “rhabdovirus no infeccioso”, el procedimiento puede ser el mismos que anteriormente, excepto que el ADNc policistrónico transfectado en las células contendría solo los genes N, P y L de rhabdovirus. El ADNc policistrónico de partículas de rhabdovirus no infeccioso pueden contener adicionalmente un gen que codifique una proteína indicadora o un ácido nucleico terapéutico. Para una descripción adicional con respecto a los procedimientos de producción de un rhabdovirus recombinante que carezca del gen codificante de la proteína G, véase Takada y col. (1997).

1. Cultivo de células para producir virus

Las células transfectadas se incuban habitualmente durante al menos 24 h a la temperatura deseada, habitualmente aproximadamente de 37. Para las partículas víricas no infecciosas, se recolectó el sobrenadante y las partículas víricas aisladas. Para las partículas víricas infecciosas, el sobrenadante que contiene el virus se recolecta y se transfiere a nuevas células. Las nuevas células se incuban durante aproximadamente 48 horas, y se recolecta el sobrenadante.

2. Purificación del rhabdovirus recombinante

Los términos “aislamiento” o “aislar” un rhabdovirus significa el proceso de cultivo y purificación de las partículas víricas de manera que permanecen muy pocos desechos celulares. Un ejemplo sería tomar el sobrenadante que contiene el virión y pasarlo a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,1-0,2 micrómetros (por ejemplo, Millex-GS, Millipore) para retirar el virus y los desechos celulares. De manera alternativa, se pueden purificar los viriones utilizando un gradiente, tal como un gradiente de sacarosa. Las partículas de rhabdovirus recombinante se pueden aglomerar y resuspender en cualquier excipiente o vehículo que se desee. Los títulos se pueden determinar por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos para las proteínas particulares.

3. Procedimientos de producción de rhabdovirus recombinantes utilizando ADNc y un minivirus o una línea celular auxiliar

Tanto los “minivirus” como las “células auxiliares” (también conocidas como “líneas celulares auxiliares”) proporcionan la misma cosa: proporcionar una fuente de proteína de rhabdovirus para el ensamblaje de viriones de rhabdovirus. Un ejemplo de un minivirus de rhabdovirus es el minivirus VSV, que expresa solo la proteína G y M,

como informan Stillman y col., (1995). Los virus auxiliares y los minivirus se utilizan como procedimientos para proporcionar proteínas de rhabdovirus que no se producen a partir del ADN transfectado que codifica los genes de proteínas de rhabdovirus.

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

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

Cuando se utiliza una línea celular auxiliar, los genes que codifican las proteínas de rhabdovirus omitidas se producen por la línea celular auxiliar. La línea celular auxiliar tiene las proteínas N, P, L y G para la producción de partículas de rhabdovirus recombinantes que no codifican la proteína G de tipo silvestre. Las proteínas se expresan a partir de genes o ADN que no son parte del genoma vírico recombinante. Estos plásmidos u otro sistema de vectores se incorporan establemente en el genoma de la línea celular. Las proteínas se producen entonces a partir del genoma celular y no a partir de un replicón en el citoplasma. La célula auxiliar puede entonces transfectarse con un ADN policistrónico y ADNc plasmídicos que contienen los otros genes de rhabdovirus que no expresa el virus auxiliar. El ARN policistrónico que se utilice dependerá de si se desea un rhabdovirus recombinante infeccioso o no infeccioso. De otra manera, se consigue el suministro los productos genéticos omitidos (por ejemplo, G y/o M) como se ha descrito anteriormente.

II. COMPOSICIONES VÍRICAS

La presente divulgación se refiere a un rhabdovirus que tiene ventajas en el estudio y tratamiento de células hiperproliferativas o neoplásicas (por ejemplo, células cancerosas) y afecciones hiperproliferativas o neoplásicas (por ejemplo, el cáncer) en un paciente. Las enseñanzas descritas posteriormente proporcionan distintos ejemplos de protocolos para implementar un virus Farmington para su uso en la invención como se define en las reivindicaciones y las composiciones para su uso en la invención como se define en las reivindicaciones. Proporcionan el entorno para la generación de virus mutantes o variantes por medio del uso de bioselección o tecnología de ADN o ácido nucleico recombinante.

A. Composiciones proteináceas

Las composiciones proteináceas de la invención incluyen las partículas víricas y composiciones que incluyen las partículas víricas, así como polipéptidos aislados. En ciertos aspectos se generan o aíslan rhabdovirus oncolíticos pseudotipados o VSV (rhabdovirus que lisan, destruyen o retrasan el crecimiento de células cancerosas). En ciertos aspectos, los rhabdovirus se modificarán para que incluyan variantes polipeptídicas de proteínas de rhabdovirus (N, P, M, G y/o L) y/o ácidos nucleicos terapéuticos que codifiquen polipéptidos terapéuticos. Otros aspectos incluyen el aislamiento de rhabdovirus que carecen de uno o más polipéptidos o proteínas funcionales. En otras realizaciones, la presente invención se refiere al virus de Farmington para su uso como se define en las reivindicaciones. Además, se contempla su uso en combinación con o incluido en composiciones proteináceas como parte de una formulación farmacéuticamente aceptable

Como se utiliza en el presente documento, una “proteína” o un “polipéptido” se refiere a una molécula que comprende un polímero de restos de aminoácido. En algunos aspectos, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la divulgación, todo o parte de una proteína o polipéptido vírico está ausente o alterado de manera que haga que el virus sea más útil para el tratamiento de un paciente. Los términos descritos anteriormente se pueden utilizar de manera intercambiable en el presente documento. Una “proteína modificada” o “polipéptido modificado” o “una variante de proteína” o “una variante de polipéptido” se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química o secuencia de aminoácidos está alterada con respecto a la de tipo silvestre o a una proteína o polipéptido de referencia. En algunos aspectos, una proteína o polipéptido modificado tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). La actividad o función modificada puede reducirse, disminuir, eliminarse, aumentarse, mejorarse, o alterase de alguna otra manera (tal como la especificidad de infección) con respecto a la actividad o función de una proteína o polipéptido de tipo silvestre, o las características del virus que contiene dicho polipéptido. Se contempla que una proteína o polipéptido modificado puede alterarse con respecto a una actividad o función mientras se mantiene la actividad o función de tipo silvestre o inalterada en otros aspectos. De manera alternativa, una proteína puede ser completamente no funcional o su secuencia de ácidos nucleicos equivalente puede haberse alterado de manera que el polipéptido no se vuelva a expresar más, esté truncado, o exprese una secuencia de ácido nucleico diferentes como resultado de un cambio de fase u otra modificación.

En ciertos aspectos, el tamaño de una proteína o polipéptido recombinante puede comprender, pero no se limita , 5,

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

Como se utiliza en el presente documento, una “molécula de aminoácido” se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido, mimético de aminoácido como conocerá un experto habituado en la técnica. En ciertos aspectos, los restos de la molécula proteinácea es secuencial, sin ninguna molécula no amino que interrumpa la secuencia de restos de moléculas de aminoácido. En otros aspectos la secuencia puede comprender uno o más restos de moléculas no amino. En aspectos particulares, la secuencia de restos de molécula proteinácea se puede interrumpir por uno o más restos de molécula no amino. En consecuencia, la expresión “composición proteinácea” engloba secuencias de moléculas de amino que comprende al menos uno de los 20 aminoácidos comunes de las proteínas sintetizadas naturalmente, o al menos un aminoácido modificado o inusual.

Las composiciones proteináceas se pueden producir por cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos, o péptidos mediante técnicas de biología molecular, el aislamiento de los compuestos proteináceos de fuentes naturales, o síntesis química de materiales proteináceos. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de distintos genes o genomas de rhabdovirus se habían desvelado previamente, y se pueden encontrar en bases de datos computarizadas conocidas por los expertos habituados en la técnica. Una de dichas bases de datos es el GenBank del Centro Nacional de información Biotecnológica y las bases de datos GenPept, a las que se puede acceder mediante internet en nc-bi.nlm.nih.gov/. Las regiones codificantes de estos genes y virus conocidos se pueden amplificar y/o expresar utilizando las técnicas desveladas en el presente documento o como es sabido por los expertos habituados en la técnica.

B. Aspectos funcionales

Cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de proteínas o polipéptidos víricos, quiere decir que se refiere a la actividad o función de esa proteína o polipéptido vírico en condiciones fisiológicas, a menos de que se especifique otra cosa. Por ejemplo, la proteína G está implicada en la especificidad y la eficacia de unión y la infección de tipos celulares particulares. La determinación de qué moléculas poseen esta actividad se puede conseguir utilizando ensayos familiares a los expertos en la técnica, tales como ensayos de infectividad, ensayos de unión proteica, ensayos de placas y similares.

C. Variantes de polipéptidos víricos

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

Las variantes de eliminación carecen de uno o más restos de la proteína nativa, sin alterar o de tipo silvestre. Se pueden eliminar restos individuales, o se pueden eliminar toto o parte de un dominio (tal como un dominio catalítico o de unión). Un codón de parada se puede introducir (por sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción normalmente implican la adición de material en un punto no terminal del polipéptido, un tipo específico de inserción es un polipéptido quimérico que incluye porciones homólogas o similares de una proteína relacionada en lugar de los restos. También se pueden generar adiciones terminales, normalmente llamadas proteínas de fusión.

Las variantes de sustitución normalmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se sustituye por otro con una forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina; serina por treonina; treonina por

serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina. De manera alternativa, las sustituciones pueden ser no conservadoras de manera que afectan a la función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservadores implican normalmente la sustitución de un resto con otro que sea distinto químicamente, tal como un aminoácido polar o con carga por un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.

La expresión “codón funcionalmente equivalente” se utiliza en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para la arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la Tabla 1, a continuación).

Tabla 1. Tabla de codones

Aminoácidos			**Codones**
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tal como aminoácidos adicionales en el extremo N o C o secuencias 5’ o 3’, y seguir siendo esencialmente como los que se exponen en el presente documento, incluyendo los que tienen una cierta actividad biológica. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a las secuencias de ácido nucleico que puede, por ejemplo, incluir distintas secuencias no codificantes flanqueando las partes 5’ o 3’ de la región codificante o que pueden incluir distintas secuencias internas, es decir, intrones, que se conoce que existen dentro de los genes.

Lo siguiente es una exposición basándose en el cambio de aminoácidos de una proteína N, P, L o G para crear una molécula equivalente, o incluso mejorada. Por ejemplo, se pueden sustituir ciertos aminoácidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin apreciar pérdida de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Como es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, se pueden hacer ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica y en su secuencia de ADN codificante subyacente, y, no obstante, producir una proteína con propiedades parecidas. Por lo tanto, los inventores contemplan que se pueden hacer distintos cambios en las secuencias de ADN de los rhabdovirus sin apreciar una pérdida de actividad o utilidad biológica de interés, como se expone posteriormente.

Al hacer dichos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para dar una función a una proteína se conoce en general en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria

de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer eficazmente basándose en la hidrofilia. La patente de EE. UU. 4.554.101, establece que el mayor promedio local de hidrofilia de una proteína, que dependerá de la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de una proteína. Como se detalla en la Patente de EE. UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (0,5); histidina *-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y seguir produciendo una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En dichos cambios la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de 62 se prefieren, los que están dentro de 61 son particularmente preferidos, y los que están dentro de 60,5 son incluso más particularmente preferidos.

Como se ha señalado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan en general en la relativa similitud de los sustituyentes de cadenas laterales del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en consideración las distintas características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina, e isoleucina.

III. MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO

La presente divulgación incluye polinucleótidos que se pueden aislar de células que son capaces de expresar todo o parte de un proteína o polipéptido vírico. En algunos aspectos de la divulgación, se refiere a todo o partes del genoma vírico que se ha mutado o alterado específicamente para generar un polipéptido vírico o virus, por ejemplo, un polipéptido rhabdovírico o virus pseudotipado o no VSV, con ciertas propiedades y/o características. Los polinucleótidos pueden codificar un péptido o polipéptido que contenga todo o parte de una secuencia de aminoácidos heteróloga o vírica o se modifican de manera que no codifiquen dicho polipéptido vírico o que codifiquen un polipéptido que tenga al menos una función o actividad añadida, aumentada, reducida, añadida, disminuida o ausente. Las proteínas recombinantes se pueden purificar a partir de células de expresión para obtener proteínas activas. Los miembros del genoma de rhabdovirus se pueden encontrar con los números de acceso al GenBank en la base de datos del NCBI o bases de datos similares.

A. Polinucleótidos que codifican proteínas nativas o modificadas

Como se utiliza en el presente documento “ARN, ADN, o segmento de ácido nucleico” se refiere a un ARN, ADN o molécula de ácido nucleico que se ha aislado libre del ADN genómico total u otros contaminantes. Por lo tanto, un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ácido nucleico que contiene secuencias de tipo silvestre, polimórficas, o que codifican polipéptidos mutantes que se han aislado de, o se han purificado libres de, ácidos nucleicos genómicos. Se incluye dentro de la expresión “segmento de ácido nucleico” los polinucleótidos, segmentos de ácido nucleico menores de un polinucleótido, y vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

Como se utiliza en la presente solicitud, la expresión polinucleótidos rhabdovírico” se puede referir a una molécula de ácido nucleico rhabdovírica pseudotipada o no VSV que codifica al menos un polipéptido rhabdovírico no VSV. En ciertos aspectos el polinucleótido se ha aislado libre de otros ácidos nucleicos. De manera similar, un “polinucleótido de virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs y/o virus Bahía Grande” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs y/o virus Bahía Grande que se ha aislado de otros ácidos nucleicos. Un “genoma rhabdovírico” o un “genoma vírico de virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs y/o virus Bahía Grande” se refiere a una molécula de ácido nucleico VSV o no VSV que se puede proporcionar a una célula huésped para obtener una partícula vírica, en presencia o ausencia de un virus auxiliar o regiones codificantes complementarias que suministren otros factores en trans. El genoma puede abre sido mutado o no en comparación con un virus de tipo silvestre o no alterado.

El término “ADNc” pretende referirse a un ADN que se prepara utilizando un ARN como matriz. Puede haber veces en las que se prefiera la secuencia genómica completa o parcial.

También se contempla que un polipéptido particular de una especie determinada puede estar representada por variantes naturales que tienen secuencias de ácidos nucleicos ligeramente diferentes, que, no obstante, codifiquen la misma proteína (véase, la Tabla 1 anteriormente).

De manera similar, un polinucleótido que codifica un polipéptido aislado o purificado de tipo silvestre o modificado se refiere a un segmento de ADN que incluye un polipéptido de tipo silvestre o mutante que codifica secuencias y, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, sustancialmente aisladas de otros genes de origen natural o secuencias codificantes de proteínas. A este respecto, el término “gen” se utiliza por simplicidad para referirse a una unidad de ácido nucleico que codifica una proteína, polipéptido, o péptido (incluyendo cualquier secuencia necesaria para la

transcripción apropiada, la modificación postraduccional, o localización). Como entenderán los expertos en la técnica, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc, y segmentos de ácido nucleico modificado más pequeños que expresen o se puedan adaptar para que expresen proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes. Una ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido nativo o modificado puede contener un ácido nucleico contiguo de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, o más pares de bases.

En aspectos particulares, la divulgación se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido rhabdovírico de tipo silvestre o mutante que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de acuerdo con, o esencialmente que se corresponde con un polipéptido nativo. El término “recombinante” se puede utilizar en conjunción con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico, y se refiere en general a un polipéptido producido por una molécula de ácido nucleico que se ha modificado *in vitro* o que es el producto replicado de dicha molécula.

En otros aspectos, la divulgación se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido o péptido que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de acuerdo con, o que se corresponde esencialmente con uno o más polipéptidos rhabdovíricos.

Los segmentos de ácido nucleico que se utilizan en la presente divulgación, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, se pueden combinar con otras secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede utilizar un fragmento de ácido nucleico casi de cualquier longitud, estando limitada la longitud total preferentemente por la facilidad de preparación y el uso del protocolo de ácido nucleico recombinante que se pretenda.

Se contempla que las construcciones de ácido nucleico de la presente divulgación pueden codificar polipéptidos de longitud completa a partir de cualquier fuente o codificar una versión truncada o modificada de los polipéptidos, por ejemplo, un polipéptido rhabdovírico truncado, de manera que la transcripción de la región codificante represente la versión truncada. La transcripción truncada puede entonces traducirse en una proteína truncada. De manera alternativa, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de polipéptido de longitud completa con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo, para permitir la purificación de los polipéptidos, el transporte, secreción modificación postraduccional, o por sus beneficios terapéuticos tales como el direccionamiento o la eficacia. Como se ha tratado anteriormente, se puede añadir a la secuencia que codifica un polipéptido modificado un marcador u otro polipéptido heterólogo, en el que “heterólogo” se refiere a un polipéptido o segmento del mismo que no es el mismo que el polipéptido modificado ni se encuentra asociado o codificado por el virus de origen natural.

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

Los segmentos de ácido nucleico que se utilizan en la presente divulgación engloban ácidos nucleicos modificados que codifican polipéptidos modificados. Dichas secuencias pueden aparecer como consecuencia de redundancia de codón y equivalencia funcional que se sabe que se produce naturalmente dentro de las secuencias de ácido nucleico y las proteínas así codificadas. De manera alternativa, se pueden crear proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que se pueden modificar cambios en la estructura proteica, basándose en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se van a intercambiar. Los cambios diseñados por el ser humano se pueden introducir mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras de la antigenicidad o la falta de la misma de la proteína, para reducir los efectos de toxicidad de la proteína *in vivo* a un sujeto al que se da la proteína, o para aumentar la eficacia de cualquier tratamiento que implique la proteína o un virus que comprenda dicha proteína.

En otros ciertos aspectos, la divulgación se refiere a segmentos aislados de ácido nucleico y vectores recombinantes que incluyen dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico contigua de entre las que se muestran en las secuencias identificadas en el presente documento. Dichas secuencias, sin embargo, se pueden mutar para obtener un producto proteico cuya actividad se altera con respecto al de tipo silvestre.

También se entenderá que la presente divulgación no se limita a las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos en particular de estas secuencias identificadas. Los vectores recombinantes y segmentos de ácido nucleico aislados pueden por lo tanto incluir de manera distinta regiones codificantes propias de rhabdovirus, regiones codificantes que tienen alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región codificante básica, o pueden codificar polipéptidos mayores que no obstante incluyan regiones codificantes de rhabdovirus, o pueden codificar proteínas o péptido que tienen secuencias de aminoácidos variantes.

Los segmentos de ácido nucleico de la presente divulgación pueden codificar proteínas y péptidos de rhabdovirus que son funcionales biológicos equivalentes, o variantes o mutantes de rhabdovirus que aumentan el beneficio terapéutico del virus. Dichas secuencias pueden aparecer como consecuencia de la redundancia del codón y la equivalencia funcional que se sabe que existe de manera natural dentro de las secuencias de ácido nucleico y las proteínas codificadas. De manera alternativa, las proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes se pueden crear mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que se pueden modificar cambios en la estructura de la proteína, basándose en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se van a intercambiar. Los cambios diseñados por un ser humano se pueden introducir mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la unión a las células cancerosas de una proteína vírica.

B. Mutagénesis de polinucleótidos rhabdovíricos

En distintos aspectos el polinucleótido de rhabdovirus se puede alterar o mutar. Las alteraciones o mutaciones pueden incluir inserciones, eliminaciones, mutaciones puntuales, inversiones y similares y pueden dar como resultado la modulación, activación y/o inactivación de ciertas proteínas o mecanismos moleculares, así como la alteración de la función, localización, o expresión de un producto genético, en particular dando lugar a un producto genético no funcional. Cuando se emplea, la mutagénesis de un polinucleótido que codifica todo o parte de un rhabdovirus se puede conseguir mediante una variedad de procedimientos mutagénicos convencionales (Sambrook y col., 2001). La mutación es el proceso por el que se producen cambios en la cantidad o estructura de un organismo. La mutación puede implicar la modificación de la secuencia de nucleótidos de un único gen, bloques de genes o genomas completos. Los cambios en genes únicos pueden ser la consecuencia de mutaciones puntuales que implican la retirada, adición o sustitución de una única base de nucleótido dentro de una secuencia de ADN, o pueden ser la consecuencia de cambios que implican la inserción o eliminación de un gran número de nucleótidos.

1. Mutagénesis aleatoria

a. Mutagénesis de inserción

La mutagénesis de inserción se basa en la inactivación de un gen mediante la inserción de un fragmento de ácido nucleico conocido. Debido a que implica la inserción de algún tipo de fragmento de ácido nucleico, las mutaciones generadas son en general de pérdida de función, más que mutaciones de ganancia de función. Sin embargo, hay varios ejemplos de inserciones que generan mutaciones de ganancia de función. Las mutagénesis de inserción se pueden conseguir utilizando técnicas de biología molecular convencionales.

b. Mutagénesis química

La mutagénesis química ofrece ciertas ventajas, tales como la capacidad de encontrar un intervalo completo de mutaciones con grados de gravedad fenotípica y e s fácil y barata de llevar a cabo. La mayoría de los carcinógenos químicos producen mutaciones en el ADN . El benzo[a]pireno, N-acetoxi-2-acetil aminofluoreno y aflatoxina B1 producen transversiones GC a TA en células bacterianas y de mamífero. El benzo[a]pireno también puede producir sustituciones de bases tales como AT a TA. Los compuestos N-nitrosourea producen transiciones GC a AT. La alquilación de la posición O4 de la timina inducida por exposición a n-nitrosourea da como resultado transiciones de TA a CG.

c. Mutagénesis por radiación

Las moléculas biológicas se degradan por radiación ionizante. La adsorción de la energía incidente da lugar a la formación de iones y radicales libre, y la rotura de algunos enlaces covalentes. La susceptibilidad al daño por radiación aparece bastante variable entre las moléculas, y entre diferentes formas cristalinas de la misma molécula. Depende de la dosis acumulada total, y también sobre la tasa de dosis (ya que una vez que están presentes los radicales libres, el daño molecular que causan depende de su tasa de difusión natural y por lo tanto del tiempo real). El daño se reduce y controla enfriando la muestra cuanto sea posible. La radiación ionizante produce daño del ADN, generalmente proporcional a la tasa de dosis.

En la presente divulgación, la expresión “radiación ionizante” significa una radiación que comprende partículas o fotones que tienen suficiente energía o pueden producir suficiente energía para producir la ionización (ganancia o

pérdida de electrones). Una radiación ionizante preferida y ejemplar es una radiación-x. La cantidad de radiación ionizante necesaria en una célula determinada o para una molécula particular depende en general de la naturaleza de esa célula o molécula y la naturaleza de la diana de la mutación. Los medios para determinar una cantidad eficaz de radiación se conocen bien en la técnica.

d. Mutagénesis de exploración *in vitro*

La mutagénesis aleatoria también se puede introducir utilizando una PCR con tendencia al error. La tasa de mutagénesis se puede aumentar llevando a cabo la PCR en múltiples tubos con dilución de las matrices. Una técnica de mutagénesis particularmente útil es la mutagénesis por exploración de alanina en la que se sustituyen varios restos individualmente con el aminoácido alanina de manera que el efecto de pérdida de interacciones de cadenas laterales se puede determinar, mientras que se minimiza el riesgo de perturbaciones a gran escala en la conformación proteica (Cunningham y col., 1989).

La mutagénesis por saturación de exploración *in vitro* proporciona un procedimiento rápido para la obtención de una gran cantidad de información estructura-función, que incluye: (i) la identificación de restos que modula la especificidad de unión al ligando, (ii) un mejor entendimiento de la unión al aligando basándose en la identificación de los aminoácidos que mantienen la actividad y los que anulan la actividad en una localización determinada (iii) una evaluación de la plasticidad completa de un sitio activo o subdominio proteico, (iv) identificación de sustituciones de aminoácidos que dan como resultado un aumento de la unión.

2. Mutagénesis dirigida al sitio

La mutagénesis específica del sitio guiada por la estructura representa una herramienta potente para la disección y modificación de las interacciones proteína-ligando (Wells, 1996; Braisted y col., 1996). La técnica proporciona la preparación y ensayo de variantes de secuencia introduciendo uno más cambios de secuencia de nucleótidos en un ADN seleccionado.

C. Vectores

Para generar mutaciones en un genoma de rhabdovirus, se pueden codificar polipéptidos nativos y modificados mediante una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término “vector” se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico exógena para su introducción en una célula donde se pueda replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser “exógena”, que significa que es ajena a la célula en la que el vector se va a introducir o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que el ácido nucleico no se encuentra comúnmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la técnica estaría equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales, que se describen en Sambrook y col. (2001) y Ausubel y col. (1994).

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

La expresión “vector de expresión” se refiere a un vector que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto genético capaz de ser transcrito. En algunos casos las moléculas de ARN se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de “secuencias de Control”, que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además, para controlar las secuencias que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven para otras funciones, así como se describe infra.

1. Promotores y Amplificadores

Un “promotor” es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico cuyo inicio y tasa de transcripción se controlan. Puede contener elementos genéticos que se unen a proteínas reguladoras y moléculas, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las frases “posicionadas operativamente”, “emparejadas operativamente”, “unidas operativamente”, “bajo control”, y “bajo el control transcripcional” significa que un promotor está en una localización funcional correcta y/u orientación en relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio y/o expresión de esa secuencia. Un promotor se puede utilizar o no en conjunción

con un “amplificación”, que se refiere a una secuencia reguladora cis-actuante implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser el que se asocia naturalmente con un gen o secuencia, como se puede obtener aislando las secuencias 5’ no codificantes localizadas corriente arriba del segmento codificante y/o exón. Se puede hacer referencia a dicho promotor como “endógeno”. De manera similar un amplificador puede asociarse naturalmente a una secuencia de ácido nucleico, que se localiza corriente abajo o corriente arriba de esa secuencia. De manera alternativa, se pueden conseguir ciertas ventajas posicionando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que no se asocia normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un amplificador recombinante o heterólogo se refiere también a un amplificador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores y amplificadores pueden incluir promotores o amplificadores de otros genes, y promotores o amplificadores aislados de cualquier otra célula procariota, víricos o eucariota, y promotores o amplificadores que no son de “origen natural”, es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras, y/o mutaciones que alteran la expresión.

Además de producir las secuencias de ácido nucleico de promotores y amplificadores sintéticamente, las secuencias pueden producirse utilizando la clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo la PCR™, en conexión con las composiciones desveladas en el presente documento (véase la Patente de EE. UU. 4.683.202, Patente de EE. UU. 5.928.906). Además, se contemplan las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares, que también se pueden emplear.

De manera natural, puede ser importante emplear un promotor y/o amplificador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo celular, orgánulo, y organismo escogido para la expresión. Los expertos en la técnica de biología molecular conocen en general el uso de promotores, amplificadores, y combinaciones de tipo celular para la expresión proteica, por ejemplo, véase Sambrook y col. (2001). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos del tejido, selectivo de la célula (es decir, más activo en un tipo celular en comparación con otro), inducible, y/o útil en las condiciones adecuadas para dirigir un alto nivel de expresión del segmento de ácido nucleico introducido, tal como sea ventajoso en la producción a gran escala de proteína y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo y endógeno.

Se pueden emplear varios elementos/promotores, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión de un gen. Esta lista no pretende ser exhaustiva de todos los elementos posibles implicados en la promoción de la expresión, sino simplemente, ser ejemplares de los mismos. también se proporcionan ejemplos de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que se puede activar en respuesta a un estímulo específico. El promotor/amplificador (Referencias) incluyen: Cadena pesada de inmunoglobulina (Banerji y col., 1983; Gilles y col., 1983; Grosschedl y col., 1985; Atchinson y col., 1986, 1987; Imler y col., 1987; Weinberger y col., 1984; Kiledjian y col., 1988; Porton y col.; 1990); cadena ligera de inmunoglobulina (Queen y col., 1983; Picard y col., 1984); Receptor de linfocitos T (Luria y col., 1987; Winoto y col., 1989; Redondo y col.; 1990); HLA DQα y/o DQβ (Sullivan y col., 1987); Interferón β (Goodbourn y col., 1986; Fujita y col., 1987; Goodbourn y col., 1988); Interleucina-2 (Greene y col., 1989); receptor de Interleucina-2 (Greene y col., 1989; Lin y col., 1990); MHC Clase II 5 (Koch y col., 1989); MHC Clase II HLA-DRα (Sherman y col., 1989); β-Actina (Kawamoto y col., 1988; Ng y col.; 1989); creatina cinasa muscular (MCK) (Jaynes y col., 1988; Horlick y col., 1989; Johnson y col., 1989); Prealbúmina (Transtiretina) (Costa y col., 1988); Elastasa I (Omitz y col., 1987); Metalotioneína (MTII) (Karin y col., 1987; Culotta y col., 1989); Colagenasa (Pinkert y col., 1987; Angel y col., 1987); Albúmina (Pinkert y col., 1987; Tronche y col., 1989, 1990); α-Fetoproteína (Godbout y col., 1988; Campere y col., 1989); γ-Globina (Bodine y col., 1987; Perez-Stable y col., 1990); β-Globina (Trudel y col., 1987); c-fos (Cohen y col., 1987); c-HA-ras (Triesman, 1986; Deschamps y col., 1985); Insulina (Edlund y col., 1985); molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Hirsh y col., 1990); a1-Antitripaína (Latimer y col., 1990); H2B (TH2B) Histona (Hwang y col., 1990); Mouse y/o colágeno Tipo I (Ripe y col., 1989); proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78) (Chang y col., 1989); Hormona de crecimiento de la rata (Larsen y col., 1986); Amiloide A sérico humano (SAA) (Edbrooke y col., 1989); Troponina I (TN I) (Yutzey y col., 1989); Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Pech y col., 1989); Distrofia muscular de Duchenne (Klamut y col., 1990); SV40 (Banerji y col., 1981; Moreau y col., 1981; Sleigh y col., 1985; Firak y col., 1986; Herr y col., 1986; Imbra y col., 1986; Kadesch y col., 1986; Wang y col., 1986; Ondek y col., 1987; Kuhl y col., 1987; Schaffner y col., 1988); Polioma (Swartzendruber y col., 1975; Vasseur y col., 1980; Katinka y col., 1980, 1981; Tyndell y col., 1981; Dandolo y col., 1983; de Villiers y col., 1984; Hen y col., 1986; Satake y col., 1988; Campbell y col., 1988); Retroviruses (Kriegler y col., 1982, 1983; Levinson y col., 1982; Kriegler y col., 1983, 1984a, b, 1988; Bosze y col., 1986; Miksicek y col., 1986; Celander y col., 1987; Thiesen y col., 1988; Celander y col., 1988; Chol y col., 1988; Reisman y col., 1989); virus del papiloma (Campo y col., 1983; Lusky y col., 1983; Spandidos y Wilkie, 1983; Spalholz y col., 1985; Lusky y col., 1986; Cripe y col., 1987; Gloss y col., 1987; Hirochika y col., 1987; Stephens y col., 1987); virus de Hepatitis B (Bulla y col., 1986; Jameel y col., 1986; Shaul y col., 1987; Spandau y col., 1988; Vannice y col., 1988); virus de inmunodeficiencia humana (Muesing y col., 1987; Hauber y col., 1988; Jakobovits y col., 1988; Feng y col., 1988; Takebe y col., 1988; Rosen y col., 1988; Berkhout y col., 1989; Laspia y col., 1989; Sharp y col., 1989; Braddock y col., 1989); Citomegalovirus (CMV) (Weber y col., 1984; Boshart y col., 1985; Foecking y col., 1986); y virus de leucemia del mono Gibón (Holbrook y col., 1987; Quinn y col., 1989).

Los elementos inducibles (Elemento/inductor (Referencias)) incluyen: MT II/Éster de Forbol (TFA), metales pesados (Palmiter y col., 1982; Haslinger y col., 1985; Searle y col., 1985; Stuart y col., 1985; Imagawa y col., 1987, Karin y col., 1987; Angel y col., 1987b; McNeall y col., 1989); MMTV (virus del tumor mamaior de ratón)/Glucocorticoides (Huang y col., 1981; Lee y col., 1981; Majors y col., 1983; Chandler y col., 1983; Lee y col., 1984; Ponta y col., 1985; Sakai y col., 1988); p-Interferon/poli(rI)x, poli(rc) (Tavernier y col., 1983); Adenovirus 5 E2/EIA (Imperiale y col., 1984); Colagenasa/ Éster de Forbol (TPA) (Angel y col., 1987a); Estromelisina/Forbol Ester (TPA) (Angel y col., 1987b); SV40/Forbol Ester (TPA) (Angel y col., 1987b); Gen MX Murino /Interferón, virus de enfermedad de Newcastle (Hug y col., 1988); GRP78 Gene/A23187 (Resendez y col., 1988); α-2-Macroglobulina/IL-6 (Kunz y col., 1989); Vimentina/Suero (Rittling y col., 1989); Gen de MHC Clase I H-2Kb/Interferón (Blanar y col., 1989); HSP70/EIA, Antígeno T grande de SV40 (Taylor y col., 1989, 1990a, 1990b); Proliferina/ Éster de Forbol -TPA (Mordacq y col., 1989); Factor de necrosis tumoral/PMA (Hensel y col., 1989); y Gen α de la hormona estimulante de tiroides /Hormona tiroidea (Chatterjee y col., 1989).

La identidad de promotores o elementos específicos de tejido o selectivos de tejido (es decir, promotores que tienen una mayor actividad en una célula en comparación con otra), así como los ensayos para caracterizar su actividad, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de dichas regiones incluyen el gen LIMK2 humano (Nomoto y col. 1999), gen del receptor 2 de somatostatina (Kraus y col., 1998), gen de unión al ácido retinoico del epidídimo murino (Lareyre y col., 1999), CD4 humano (Zhao-Emonet y col., 1998), alfa 2 (XI) colágeno de ratón (Tsumaki, y col., 1998), D1A gen receptor de dopamina (Lee, y col., 1997), Factor II de crecimiento tipo insulina (Wu y col., 1997), molécula-1 de adhesión celular de plaquetas humana (Almendro y col., 1996), y el promotor SM22a.

Los promotores víricos adicionales, promotores/amplificadores celulares y promotores/amplificadores inducibles que se pueden utilizar en combinación con la presente divulgación se enumeran en el presente documento. Adicionalmente, también se podría utilizar cualquier combinación de promotor/amplificador (como por la Base de datos de promotores de eucariotas EPDB) para dirigir la expresión de genes estructurales que codifican enzimas que procesan oligosacáridos, proteínas accesorias de plegamiento proteico, proteínas de marcador genético o una proteína heteróloga de interés. De manera alternativa, se puede emplear un promotor específico de tejido para la terapia genética del cáncer (Tabla 2) o el direccionamiento a tumores (Tabla 3) con las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación.

Tabla 2. Promotores específicos de tejido candidatos para la terapia genética

Promotor específico de tejido	**Cánceres en los que el promotor es activo**	**Células normales en los que el promotor es activo**
Antígeno carcinoembrionario (CEA)*	La mayoría de los carcinomas colorrectales; el 50 % de carcinomas de pulmón; un 40-50 % de carcinomas gástricos; la mayoría de los carcinomas pancreáticos; la mayoría de los carcinomas de mama	Mucosa colónica; mucosa gástrica; epitelio pulmonar; glándulas sudoríparas exocrinas; células testiculares
Antígeno específico de próstata (PSA)	La mayoría de los carcinomas de próstata	Epitelio prostático
Péptido vasoactivo intestinal (VIP)	La mayoría de los cánceres de pulmón de células no pequeñas	Neuronas; linfocitos; mastocitos; eosinófilos
Tensioactivo proteico A (SP-A)	Muchas células de adenocarcinomas de pulmón	Neumocitos tipo II; Clara
Homólogo achaete-scute humano (hASH)	La mayoría de los cánceres de pulmón de células pequeñas	Células neuroendocrinas de pulmón
Mucina-1 (MUC1)**	La mayoría de los adenocarcinomas (que se originan en cualquier tejido)	Células epiteliales glandulares en la mama y en tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario
Alfa-fetoproteína	La mayoría de los carcinomas hepatocelulares; posiblemente muchos cánceres testiculares	Hepatocitos (en ciertas condiciones); testículos
Albúmina	La mayoría de los carcinomas hepatocelulares	Hepatocitos
Tirosinasa	La mayoría de los melanomas	Melanocitos; astrocitos; células de Schwann; algunas neuronas

(continuación)

Promotor específico de tejido	**Cánceres en los que el promotor es activo**	**Células normales en los que el promotor es activo**
Proteína de unión a tirosina (TRP)	La mayoría de los melanomas	Melanocitos; astrocitos; células de Schwann; algunas neuronas
Queratina 14	Presumiblemente muchos carcinomas de células escamosas (por ejemplo, cánceres de cabeza y cuello)	Queratinocitos
EBV LD-2	Muchos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello	Queratinocitos del tracto digestivo superior
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	Muchos astrocitomas	Astrocitos
Proteína básica mielina (MBP)	Muchos gliomas	Oligodendrocitos
Enzima convertidora de angiotensina específica de los testículos (ECA específica de testículos)	Posiblemente muchos cánceres testiculares	Espermatocitos
Osteocalcina	Posiblemente muchos osteosarcomas	Osteoblastos

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

Promotor	**Cánceres en los que el promotor está activo**	**Células normales en las que el promotor está activo**
Promotor regulado E2F	Casi todos los cánceres	Células proliferativas
HLA-G	Muchos carcinomas colorrectales; muchos melanomas; posiblemente muchos otros cánceres	Linfocitos; monocitos; espermatocitos; trofoblastos;
FasL	La mayoría de los melanomas; muchos carcinomas pancreáticos; la mayoría de los astrocitomas; posiblemente muchos otros cánceres	Leucocitos activados; neuronas; células endoteliales; queratinocitos; células en tejidos inmunoprivilegiados; algunas células en los pulmones, ovarios, hígado, y próstata
Promotor regulado Myc	La mayoría de los carcinomas de pulmón (tanto de células pequeñas y no pequeñas); la mayoría de los carcinomas colorrectales	Células proliferativas (solo algunos tipos celulares); células epiteliales de mamífero (incluyendo no proliferativas)
MAGE-1	Muchos melanomas; algunos carcinomas de pulmón de células no pequeñas; algunos carcinomas de mama	Testículos
VEGF	El 70 % de todos los cánceres (sobre expresión constitutiva en muchos cánceres)	Células en los sitios de neovascularización (pero a diferencia de los tumores, la expresión es transitoria, menos fuerte, y nunca constitutiva)
bFGF	Presumiblemente muchos cánceres diferentes ya que la expresión de bFGF está inducida por condiciones de isquemia	Las células en los sitios de isquemia (pero a diferencia de los tumores, la expresión es transitoria, menos fuerte y nunca constitutiva)
COX-2	La mayoría de los carcinomas colorrectales; muchos carcinomas de pulmón; posiblemente muchos otros cánceres	Las células en el sitio de la inflamación

(continuación)

Promotor	Cánceres en los que el promotor está activo	Células normales en las que el promotor está activo
IL-10	La mayoría de los carcinomas colorrectales; muchos carcinomas de pulmón; muchos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello; posiblemente otros muchos cánceres	Leucocitos
GRP78/BiP	Presumiblemente muchos cánceres diferentes, ya que la expresión de GRP7S está inducida por condiciones específicas del tumor.	Células en el sitio de isquemia
elementos CarG de Egr-1	Inducidos por radiación ionizante, concebible en la mayoría de los tumores al irradiarlos	Células expuestas a radiación ionizante; leucocitos

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

También puede ser necesaria una señal de inicio para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede que sea necesario proporcionar las señales de control traduccional exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto habituado en la técnica sería capaz fácilmente de determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Se sabe bien que el codón de inicio debe estar "en fase" con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Las señales de control traduccional exógenas y codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión puede aumentar mediante la inclusión de elementos amplificadores de la transcripción apropiados.

En ciertos aspectos de la divulgación, el uso de elementos de sitios internos de entrada en el ribosoma (IRES) se utilizan para crear mensajes multigenéticos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de sobrepasar el modelo de exploración del ribosoma de traducción dependiente de la protección metilada 5' y comienza la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES se pueden unir a fases de lectura abierta heterólogas. Se pueden transcribir múltiples fases de lectura abierta a la vez, cada una separada por un IRES, creando mensajes policistrónicos. Gracias al elemento IRES cada fase de lectura abierta es accesible a los ribosomas para una traducción eficaz. Se pueden expresar eficazmente múltiples genes utilizando un único promotor/amplificador para transcribir un único mensaje (véase las Patentes de EE. UU. 5.925.565 y 5.935.819).

3. Múltiples sitios de clonación

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción cualquiera de los cuales se puede utilizar junto con una tecnología recombinante convencional para digerir el vector (Véase Carbonelli y col., 1999, Levenson y col., 1998, y Cocea, 1997). "Digestión por enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en localizaciones específicas de la molécula de ácido nucleico. Muchas d estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas se entiende ampliamente por los expertos en la técnica. Frecuentemente, se linealiza un vector o fragmento utilizando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que se liguen secuencias externas al vector. "Ligadura" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser contiguos entre ellos o no. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligadura son bien conocidas por los expertos en la técnica de la tecnología recombinante.

4. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención comprenderán en general al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" está comprendido por secuencias de ARN implicadas en la terminación específica de una transcripción de ARN por una ARN polimerasas. Por tanto, en ciertos aspectos se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de una transcripción de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para conseguir niveles deseados de mensaje.

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

Los terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador de la transcripción conocido descrito en el presente documento o conocidos por los expertos habituados en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tales como, por ejemplo, el terminador de la

hormona de crecimiento bovina o las secuencias de terminación víricas, tales como, por ejemplo, el terminador de SV40. En ciertos aspectos, la señal de terminación puede ser una falta de secuencia que se pueda transcribir o traducir, tal como debido a un truncado de secuencia.

5. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente en la expresión en eucariotas, se incluirá normalmente una señal de poliadenilación para efectuar una poliadenilación apropiada de la transcripción. Se cree que naturaleza de la señal de poliadenilación no es crucial para la práctica satisfactoria de la divulgación y/o se puede utilizar cualquier secuencia. Los aspectos preferidos incluyen la señal de poliadenilación del SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, que son convenientes y/o se sabe que funcionan bien en distintas células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad de la transcripción o puede facilitar el transporte citoplásmico.

6. Orígenes de replicación

Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más orígenes de replicación (a menudo denominados “ori”), que es una secuencia de ácido nucleico que la que se inicia la replicación. De manera alternativa se puede emplear una secuencia que se replica autónomamente (ARS) si la célula huésped es una levadura.

7. Marcadores que se pueden seleccionar y explorar

En ciertos aspectos de la divulgación, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la divulgación se pueden identificar *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores darían lugar a un cambio identificable en la célula que permita la identificación fácil de las células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador de selección es el que otorga una propiedad que permite la selección. Un marcador genético positivo es el que en presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador genético negativo es el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de marcador genético positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Habitualmente la inclusión de un marcado genético de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, son útiles los genes que dan lugar a una resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol como marcadores genéticos. Además de los marcadores que dan lugar a un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes basándose en la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores incluyen los marcadores que puede explorarse tales como la GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. De manera alternativa, se pueden utilizar marcadores que se pueden explorar tales como la timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la técnica también conocería cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente en conjunción con el análisis FACS. No se cree que el marcador que se utilice sea importante, a condición de que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifique un producto genético. Los ejemplos adicionales de marcadores que se pueden seleccionar y explorar son bien conocidos por el experto en la técnica.

D. Células huésped

Como se utiliza en el presente documento, los términos “célula”, “línea celular”, y “cultivo celular” se pueden utilizar de manera intercambiable. Todos estos términos incluyen también su progenie, que son todas y cada una de las generaciones siguientes. Se entiende que toda progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heterólogo, una “célula huésped” se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluyen cualquier organismo que se pueda transformar que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula huésped, puede utilizarse y se ha utilizado como receptor de vectores o virus (que no se califica como vector si no expresa polipéptidos exógenos). Una célula huésped puede estar “transfectada” o “transformada”, que se refiere a un proceso por el que el ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia que codifica una proteína modificada, se transfiere o introduce en la célula huésped. Una célula transformada incluye el sujeto celular primario y su progenie.

Las células huésped se puede derivar de procariotas o eucariotas, incluyendo células de levadura, células de insecto y células de mamífero, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de parte o todas las secuencias de ácido nucleico codificadas por el vector. Están disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para su uso como células huésped, y se pueden obtener en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y materiales genéticos (www.atcc.org). Un huésped apropiado puede determinarlo un experto en la técnica basándose en la estructura del vector y el resultado deseado. Por ejemplo, se puede introducir un plásmido o cósmido en una célula huésped procariota para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas utilizadas como células huésped para la replicación y/o expresión de un vector incluyen DH5α, JM109, y KC8, así como varios huéspedes bacterianos disponibles en el mercado tales como células competentes SURE® y SOLOPACK™ Gold Cells (STRATAGENE®, La Jolla, CA). De manera alternativa se podrían utilizar células bacterianas tales como *E. coli* LE392 como células huésped para virus fagos. Las células de levadura apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pombe, y Pichia pastoris*.

Ejemplos de células huésped eucariotas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen HeLa, NiH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, y PC12. Muchas células huésped de distintos tipos celulares y organismos están disponibles y son conocidas por un experto en la técnica. De manera similar, se puede utilizar un vector vírico en conjunción con cualquier célula huésped eucariota o procariota, particularmente una que sea permisiva a la replicación o expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que permitan que se replique o se exprese en células tanto procariotas como eucariotas. Un experto en la técnica entendería adicionalmente las condiciones en las que incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También se entienden y conocen técnicas y condiciones que permitirían la producción de vectores a gran escala, así como la producción de ácidos nucleicos codificados por los vectores y sus polipéptidos, proteínas, o péptidos equivalentes.

E. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos todas o parte de las composiciones expuestas anteriormente. Los sistemas basados en procariotas y eucariotas pueden emplearse para su uso con la presente invención para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas o péptidos equivalentes. Muchos de dichos sistemas están disponibles en el mercado y ampliamente.

El sistema insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión proteica de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las Patentes de EE. UU. 5.871.986 y 4.879.236, y se puede comprar, por ejemplo, con los nombres MAXBAC® 2.0 de INVITROGEN® y BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM de CLONTECH®.

Además de los sistemas de expresión desvelados de la invención, otros sistemas de expresión incluyen el STRATAGENE®'s COMPLETE CONTROL™ Inducible Mammalian Expression System, que implica un ecepotr inducible ecdysone sintético o su Sistema de Expresión pET, una sistema de expresión en *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible en INVITROGEN®, que tiene el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión en mamíferos indicuible que utiliza un promotor CMV de longitud completa. INVITROGEN® también proporciona un sistema de expresión en levaduras llamado Sistema de Expresión metanólica en Pichia, que se ha diseñado para la producción a alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la técnica sabría como expresar un vector, tal como una construccioon de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido equivalente.

F. Detección de ácidos nucleicos

Además de su uso en el direccionamiento de la expresión de proteínas, polipéptidos y/o péptidos de poxvirus, las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento tienen una variedad de otros usos. Por ejemplo, son útiles como sondas o cebadores para las realizaciones que implican la hibridación de ácidos nucleicos. Se pueden utilizar en procedimientos de diagnóstico y exploración de la presente divulgación. La detección de ácidos nucleicos que codifican rhabdovirus o moduladores polipeptídicos de rhabdovirus están englobados en la divulgación.

1. Hibridación

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

En consecuencias, las secuencias de nucleótido de la divulgación pueden utilizarse por su capacidad para formar selectivamente moléculas dobles con tramos complementarios de ADN y/o ARN o proporcionar cebadores para la amplificación de ADN o ARN a partir de muestras. Dependiendo de la aplicación planeada, sería deseable emplear condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda o cebadores para la secuencia diana.

Para las aplicaciones que necesitan una alta selectividad, se deseará normalmente emplear condiciones de alta rigurosidad para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de relativamente baja salinidad y/o alta temperatura, tal como las provistas por aproximadamente un 0,02 M a aproximadamente 0,10 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 50 ºC a aproximadamente 70 ºC. Dichas condiciones de alta rigurosidad toleran pocas, si alguna, faltas de coincidencia entre la sonda o los cebadores y la matriz o cadena diana y serían particularmente adecuadas para el aislamiento de genes específicos o para la detección de transcripciones de ARNm específicas. Se aprecia en

general que las condiciones pueden dar más rigurosidad por la adición de cantidades crecientes de formamida.

Para ciertas aplicaciones, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, se aprecia que se prefieren condiciones de menor rigurosidad. En estas condiciones la hibridación puede producirse incluso entre las secuencias de cadenas de hibridación que no son perfectamente complementarias, sino que ha y faltas de coincidencia en una o más posiciones. Las condiciones pueden dar menos rigurosidad aumentando la concentración de sal y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, las condiciones de rigurosidad media se podrían proporcionar con aproximadamente 0,1 a 0,25 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 37 ºC a aproximadamente 55 ºC, mientras que unas condiciones de baja rigurosidad se pueden proporcionar con aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas que varían desde aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 55 ºC. Las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otros aspectos, la hibridación se puede conseguir en condiciones de, por ejemplo, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl2, 1,0 mM de ditiotreitol, a temperaturas entre aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 37 ºC. Otras condiciones de hibridación que se utilizan incluyen aproximadamente 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl2, a temperaturas que varían desde aproximadamente 40 ºC a aproximadamente 72 ºC.

En ciertos aspectos, sería ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con un medio apropiado tal como un marcador, para la determinación de la hibridación. Se conocen en la técnica una amplia variedad de medios indicadores apropiados, que incluyen fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que son capaces de detectarse. En aspectos preferidos, se puede desear emplear un marcador fluorescente o un marcador enzimático tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en vez de un reactivo radioactivo u otro ambientalmente indeseable. En el caso de marcadores enzimáticos, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden emplear para proporcionar un medio de detección que sea visible o detectable espectrofotométricamente, para identificar una hibridación específica con muestras que contengan ácidos nucleicos complementarios.

En general, se planea que las sondas o cebadores descritos en el presente documento serán útiles como reactivos en una solución de hibridación, como en una PCR™, para la detección de la expresión de genes correspondientes, así como en aspectos que emplean una fase sólida. Aquí, el ensayo de ADN (o ARN) se adsorbe o se fija de otra manera a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico de cadena sencilla fijado se somete entonces a hibridación con sondas seleccionadas en condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido en G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente del ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para una aplicación particular de interés es bien conocida por los expertos en la técnica. Después del lavado de las moléculas hibridadas para retirar las moléculas de sonda unidas no específicamente, se detecta la hibridación /o se cuantifica, determinando la cantidad de marcador unido. Los procedimientos de hibridación en fase sólida representativos se desvelan en las Patentes de EE. UU. 5.843.663. 5.900.481 y 5.919.626. Otros procedimientos de hibridación que se pueden utilizar en la práctica de la presente invención se desvelan en las Patentes de EE. UU. 5.849.481. 5.849.486 y 5.851.772.

2. Amplificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos utilizados como matriz para la amplificación se pueden aislar de células, tejidos u otras muestras de acuerdo con metodologías convencionales (Sambrook y col., 2001). En ciertas realizaciones, se llevan a cabo análisis sobre homogenados de células completas o tejidos o muestras de fluidos biológicos sin una purificación sustancial del ácido nucleico matriz. El ácido nucleico pquede ser un ADN genómico o un ARN celular completo o fraccionado. Cuando se utiliza un ARN, puede que se desee convertir primero el ARN en un ADN complementario.

El término “cebador” como se utiliza en el presente documento, significa que engloba cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico que surge en un procedimiento dependiente de la matriz. Normalmente, los cebadores son oligonucleótidos de desde diez a veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden prorpocioanr en forma de cadena doble y/o cadena sencilla, aunque se prefiere la forma de cadena sencilla.

Los pares de cebadores diseñados para hibridarse selectivamente con los ácidos nucelcios correspondientes a secuencias de los genes identificados en el presentete documento se ponen en ocnt acto con el ácido nucleico diana en condiciones que permitan la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada se pueden seleccionar condiciones de hibridación de alta rigurosidad que solo permitirá la hibridación a secuencias que sean completamente complementarias a los cebadpres. En otros aspectos, la hibridación se puede producir econ una rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contengan una o más faltas de coincidencia con las secuencias de cebador. Una vez hibridado, el complejo cebador matriz se pone en ocnt acto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de la matriz. Se llevan a cabo múltiples rondas de amplificación, a las que también se hace referencia como “ciclos” hasta que se produce una suficiente cantidad del producto de amplificación.

Varios procedimientos dependientes de la matriz están disponibles para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una matriz de muestra determinada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (a la que se hace referencia como PCR™) que se describe en detalle en las Patentes de EE. UU. 4.683.195. 4.683.202 y 4.800.159, y in Innis y col., 1988.

Se puede llevar a cabo un procedimiento de amplificación por PCR™ de transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado y son bien conocidos (véase Sambrook y col., 2001; documento WO 90/07641; y Patente de EE. UU. 5.882.864).

Otro procedimiento para la amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR") desvelada en la Solicitud europea N.º 320 308. La Patente de EE. UU. 4.883.750 describe un procedimiento similar a la LCR para la unión de pares de sondas a una secuencia diana. También se puede utlziar un procedimiento basado en la PCR™ y ensayo de ligasa de oligonucleótidos (OLA) desvelado en la Patente de EE. UU 5.912.148 Los procedimientos alternativos para la amplificación de secuencias de ácido nucleico que se pueden utilizar en la práctica de la presente invención se desvelan en las Patentes de EE. UU. 5.843.650. 5.846.709. 5.846.783. 5.849.546. 5.849.497. 5.849.547. 5.858.652. 5.866.366. 5.916.776. 5.922.574. 5.928.905. 5.928.906. 5.932.451. 5.935.825. 5.939.291 y 5.942.391, Solicitud GB N.º 2 202 328, y en la Solicitud PCT N.º PCT/US89/01025.La Qbeta replicasa, dsecrita en la Solicitud PCT N.º PCT/US87/00880, también se puede utilizar como un procedimiento de amplificación de la presente invención. La amplificación isotérmica como se describe en Walker y col. (1992) también se puede utilizar. Así como la Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), desvelada en la Patente de EE. UU. 5.916.779.

Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), que incluyen la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh y col., 1989; Solicitud PCT WO 88/10315). Solicitud europea N.º 329 822 desvela un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que implica la síntesis cíclica de ARN de cadena sencilla ("ssARN"), ssADN, y ADN de cadena doble (dsADN), que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

La solicitud PCT WO 89/06700 desvela un esquema de amplificación de ácido nucleico basado en la hibridación de una región promotora/secuencia cebadora con un ADN de cadena sencilla diana ("ssADN") seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Otros procedimientos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR de un lado" (Frohman, 1990; Ohara y col., 1989).

3. Detección de ácidos nucleicos

A continuación de cualquier amplificación, puede ser deseable separar y/o aislar el producto de amplificación de la matriz y el exceso de cebadores. En un aspecto los productos de amplificación se separan por electroforesis en agarosa, agarosa-acrilamida, o en gel de poliacrilamida utilizando procedimientos convencionales (Sambrook y col., 2001).

La separación de ácidos nucleicos también se puede efectuar por técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografía que se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, incluyendo la adsorción, partición, intercambio iónico, hidroxilapatita, filtro molecular, fase inversa, columna, papel, capa fina y cromatografía de gases, así como HPLC.

Los procedimientos de visualización típicos incluyen la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de las bandas bajo luz UV. De manera alternativa, si los productos de amplificación están marcados íntegramente con nucleótidos marcados radio o fluorométricamente, los productos de amplificación separados se pueden exponer a una película de rayos X o visualizarse en un espectro de excitación apropiado.

En aspectos particulares, la detección es transferencia de Southern e hibridación con una sonda marcada. Las técnicas que implican la transferencia de Southern son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase Sambrook y col., 2001). Un ejemplo de lo anterior se describe en la Patente de EE. UU. 5.279.721, que desvela un aparato y un procedimiento automático para la electroforesis y la transferencia de ácidos nucleicos.

Otros procedimientos de detección de ácidos nucleicos que se pueden utilizar en la práctica de la presente invención se desvelan en las Patentes de EE. UU. 5.840.873. 5.843.640. 5.843.651. 5.846.708. 5.846.717. 5.846.726. 5.846.729. 5.849.487. 5.853.990. 5.853.992. 5.853.993. 5.856.092. 5.861.244. 5.863.732. 5.863.753. 5.866.331. 5.905.024. 5.910.407. 5.912.124. 5.912.145. 5.919.630. 5.925.517. 5.928.862. 5.928.869. 5.929.227. 5.932.413 y 5.935.791.

4. Otros ensayos

Se pueden utilizar otros procedimientos para la exploración genética dentro del ámbito de la presente divulgación, por ejemplo, para detectar mutaciones en muestras de ácidos nucleicos genómicos, ADNc y/o ARN. Los procedimientos que se utilizan para detectar mutaciones puntuales incluyen la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante ("DGGE"), análisis de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción ("RFLP"), procedimientos de escisión química o enzimática, secuenciación directa de las regiones diana amplificadas por PCR™ (véase anteriormente), análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla ("SSCP") y otros

procedimientos bien conocidos en la técnica. Un procedimiento de exploración para mutaciones puntuales se basa en la escisión por RNasa de malas coincidencias de pares de bases en ARN/ADN o ARN/ARN heterodúplex. Como se utiliza en el presente documento "mala coincidencia" se define como una región de uno o más nucleótidos no emparejados o mal emparejados en una molécula de cadena doble de ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN. Esta definición incluye por lo tanto las malas coincidencias debido a mutaciones de inserción/eliminación, así como mutaciones puntuales de bases múltiples o sencillas (por ejemplo, véase la Patente de EE. UU. 4.946.773. Los procedimientos alternativos para la detección de mutaciones de eliminación, inserción o sustitución que se pueden utilizar en la práctica de la presente invención se desvelan en las Patentes de EE. UU. 5.849.483. 5.851.770. 5.866.337. 5.925.525 y 5.928.870.

G. Procedimientos de trasferencia genética

Los procedimientos adecuados para el suministro de ácido nucleico para efectuar la expresión de las composiciones de la presente divulgación se cree que incluyen virtualmente cualquier procedimiento por el cual un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN o ARN incluyendo vectores víricos y no víricos) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como es conocido por un experto en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a l suministro directo de ácido nucleico tal como por inyección (Patentes de EE. UU. 5.994.624. 5.981.274. 5.945.100. 5.780.448. 5.736.524. 5.702.932. 5.656.610. 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo la microinyección (Harland y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. 5.789.215); electroporación (Patente de EE. UU. 5.384.253); por precipitación en fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando dextrano DEAE seguido por polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo con microproyectiles (Solicitudes PCT N.º WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. 5.610.042; 5.322.783 5.563.055. 5.550.318. 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppler y col., 1990; Patentes de EE. UU. 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por Agrobacterium (Patentes de EE. UU 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación de protoplastos mediada por PEEG (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985). Mediante la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

H. Componentes y restos lipídicos

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados con un ácido nucleico, una molécula de aminoácido, tal como un péptido, u otro compuesto de molécula pequeña. En cualquiera de los aspectos expuestos en el presente documento, la molécula puede ser un polipéptido de rhabdovirus o un modulador polipeptídico de rhabdovirus, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido de rhabdovirus, o alternativamente, una molécula de ácido nucleico que codifica todo o parte del modulador polipeptídico de rhabdovirus. Un lípido es una sustancia que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Los compuestos distintos de los descritos específicamente en el presente documento se entienden por el experto en la técnica como lípidos, y están englobados en las composiciones y procedimientos de la presente divulgación. Un componente lipídico y no lipídico se pueden unir entre ellos sea covalente o no covalentemente.

Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el ser humano). Sin embargo, un lípido normalmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, glicoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos unidos por un éster y un éter y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

Una molécula de ácido nucleico o molécula de aminoácido, tal como un péptido, asociado con un lípido se puede dispersar en una solución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido o asociarse de otra manera con un lípido. Un lípido o composición asociada con un virus/lípido de la presente invención no se limita a cualquier estructura en particular. Por ejemplo, pueden estar simplemente intercalados en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes ni en tamaño ni en forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". En otro ejemplo no limitante, también se contempla un complejo lipofectamina (Gibco BRL)-poxvirus o Superfect (Qiagen)-virus.

En ciertos aspectos, una composición lipídica puede comprender aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 % aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 21 %, aproximadamente un 22 %, aproximadamente un 23 %, aproximadamente un 24 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 26 %, aproximadamente un 27 %, aproximadamente un 28 %, aproximadamente un 29 %, aproximadamente un 30 %,

aproximadamente un 31 %, aproximadamente un 32 %, aproximadamente un 33 %, aproximadamente un 34 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 36 %, aproximadamente un 37 %, aproximadamente un 38 %, aproximadamente un 39 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 41 %, aproximadamente un 42 %, aproximadamente un 43 %, aproximadamente un 44 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 46 %, aproximadamente un 47 %, aproximadamente un 48 %, aproximadamente un 49 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 51 %, aproximadamente un 52 %, aproximadamente un 53 %, aproximadamente un 54 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 56 %, aproximadamente un 57 %, aproximadamente un 58 %, aproximadamente un 59 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 61 %, aproximadamente un 62 %, aproximadamente un 63 %, aproximadamente un 64 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 66 %, aproximadamente un 67 %, aproximadamente un 68 %, aproximadamente un 69 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 71 %, aproximadamente un 72 %, aproximadamente un 73 %, aproximadamente un 74 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 76 %, aproximadamente un 77 %, aproximadamente un 78 %, aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 81 %, aproximadamente un 82 %, aproximadamente un 83 %, aproximadamente un 84 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 86 %, aproximadamente un 87 %, aproximadamente un 88 %, aproximadamente un 89 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 100 %, o cualquier intervalo derivado de estos, de un lípido particular, tipo de lípido, o un componente no lipídico tal como un fármaco, proteína, azúcar, ácido nucleico u otro material desvelado en el presente documento o como conoce un experto en la técnica. En un ejemplo no limitante, una composición lipídica puede comprender aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % de lípidos neutros, y aproximadamente de un 33 % a aproximadamente un 34 % de un cerebrósido, y aproximadamente un 1 % de colesterol. Por lo tanto, se contempla que las composiciones lipídicas de la presente divulgación pueden comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípido, u otros componentes en cualquier intervalo de combinaciones o porcentajes.

IV. FORMULACIONES FARMACÉUTICAS Y REGÍMENES DE TRATAMIENTO

En un aspecto de la presente divulgación, se contempla un procedimiento de tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa o neoplásica, tal como el cáncer, mediante el suministro de un rhabdovirus no VSV, tal como el virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs, y/o virus Bahía Grande. Ejemplos del cáncer contemplado por el tratamiento incluyen el cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de huesos, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer gastrointestinal, linfomas, lesiones preneoplásicas, lesiones preneoplásicas del pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer de vejiga, y cualquier otro cancero tumor que se pueda tratar, incluyendo los cánceres metastáticos o distribuidos sistémicamente.

Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, en general, se define como la cantidad suficiente para de manera detectable y repetida enlentece, mejora, reduce, minimiza, o limita la extensión de la enfermedad o sus síntomas. Se pueden aplicar definiciones más rigurosas, incluyendo la eliminación, erradicación o cura de la enfermedad.

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

A. Administración

Para destruir las células, inhibir el crecimiento celular, inhibir las metástasis, disminuir el tamaño del tumor o tejido, e invertir, parar o reducir de otra manera el fenotipo maligno de las células tumorales, utilizando los procedimientos y composiciones de la presente divulgación, generalmente se pondría en contacto una célula hiperproliferativa o neoplásica con una composición terapéutica tal como un virus o una construcción de expresión que codifique un polipéptido. Las vías de administración variaran, naturalmente, con la localización y naturaleza de la lesión, e incluyen, por ejemplo, la administración y formulación intradérmica, transdérmica, parenteral, intravascular, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, regional, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravesical, intratumoral, por inhalación, perfusión, lavado, inyección directa, alimentaria, y oral.

Para efectuar un beneficio terapéutico con respecto a una enfermedad o afección vascular, se pone en contacto una célula vascular con el compuesto terapéutico. Cualquiera de las formulaciones y vías de administración expuestas con respecto al tratamiento o diagnóstico del cáncer también se pueden emplear con respecto a enfermedades y afecciones vasculares.

La inyección intratumoral, o inyección en el sistema vascular tumoral se contempla para tumores separados, sólidos accesibles. La administración local, regional o sistémica también se contempla, particularmente para los cánceres que se ha determinado que es probable que se diseminen sistémicamente. Las partículas víricas se pueden administrar durante al menos o como mucho en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 inyecciones.

En el caso de una intervención quirúrgica, la presente divulgación puede utilizarse preoperativamente, para hacer que un tumor inoperable se someta a resección. De manera alternativa, la presente divulgación se puede utilizar en el momento de la cirugía, y/o después, para tratar la enfermedad residual o metastática. Por ejemplo, un lecho de tumor resecado se puede inyectar o perfundir con una formulación que comprende un polipéptido de rhabdovirus o un rhabdovirus, que puede tener o no una mutación, que sea ventajosa para el tratamiento del cancero células cancerosas. La perfusión puede continuar post-resección, por ejemplo, dejando un catéter implantado en el sitio de la cirugía. El tratamiento posquirúrgico periódico también se ha planeado.

También se puede aplicar la administración continua si fuera apropiado, por ejemplo, cuando el tumor se escinde y el lecho del tumor se trata para eliminar una enfermedad residual microscópica. El suministro mediante una jeringa o catéter se prefiere. Dicha perfusión continúa puede tener lugar durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1-2 horas, a aproximadamente 2-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o más después el inicio del tratamiento. En general la dosis de la composición terapéutica mediante la perfusión continua será equivalente a la que se da mediante una inyección única o múltiples inyecciones, se ajusta durante un periodo de tiempo durante el que se produce la perfusión. Se contempla adicionalmente, que se puede utilizar la perfusión de una extremidad para administrar composiciones terapéuticas de la presente invención, particularmente en el tratamiento de melanomas y sarcomas.

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

En ciertos aspectos, el tumor que se va a tatar puede que no sea, al menos inicialmente, resecable. Los tratamientos con construcciones víricas terapéuticas pueden aumentar la operabilidad del tumor debido al encogimiento de los márgenes o por eliminación de ciertas partes particularmente invasivas. A continuación de los tratamientos puede ser posible la resección. Los tratamientos adicionales después de la resección servirán para eliminar la enfermedad microscópica residual en el sitio del tumor.

Un curso típico de tratamiento, para un tumor primario o un lecho post-escisión tumoral, implicará múltiples dosis. Un tratamiento de tumor primario típico implica 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más aplicaciones de dosis durante periodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 semanas o más. Se puede repetir un régimen de dos semanas una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más veces. Durante el curso de tratamiento, se puede reevaluar la necesidad de completar las dosis planeadas.

Los tratamientos pueden incluir “dosis unitarias”. Una dosis unitaria se define como que contiene una cantidad predeterminada de una composición terapéutico. La cantidad que se va a administrar, y la vía y formulación en particular, están dentro de la técnica de los expertos en las técnicas clínicas. Una dosis unitaria no se necesita administrar como una inyección única, sino que puede comprender una infusión continúa durante un periodo de tiempo fijado. La dosis unitaria de la presente invención puede describirse convenientemente en términos de unidades formadoras de placas (ufp) o partículas víricas para las construcciones víricas. Las dosis unitarias varían desde 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} ufp o pv y más. De manera alternativa, dependiendo del tipo de virus y el título alcanzable, se suministrarán 1 a 100, 10 a 50, 100-1000, o hasta aproximadamente 1×10^4, 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10}, 1×10^{11}, 1×10^{12}, 1×10^{13}, 1×10^{14}, o 1×10^{15} o más partículas víricas (pv) infecciosas al paciente o las células del paciente.

B. Composiciones y formulaciones inyectables

El procedimiento preferido para el suministro de una construcción de expresión o virus que codifica todo o parte de un genoma rhabdovírico a las células cancerosas o tumorales en la presente divulgación es mediante inyección intravascular. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden administrar de manera alternativa por vía intratumoral, parenteral, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, transdérmica o incluso intraperitoneal como se describe en las Patentes de EE. UU. 5,543,158, 5.641.515 y 5.399.363.

La inyección de construcciones de ácido nucleico se puede suministrar mediante jeringa o cualquiera otro procedimiento utilizado para la inyección de una solución a condición de que la construcción de expresión pueda pasar a través de un calibre de aguja determinado necesario para la inyección (por ejemplo, véase las Patentes de EE. UU. 5.846.233 y 5.846.225).

Las soluciones de los principios activos como base libre o sales aceptables farmacológicamente se pueden preparar en agua mezclad adecuadamente con un tensioactivo, tal como la hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones (Patente de EE. UU. 5.466.468) En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el

punto de que se pueda suministrar fácilmente en una jeringa. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño necesario de partícula en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede llevar a cabo mediante distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorbutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería estar tamponada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se hace isotónico primero con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral, e intraperitoneal. En esta conexión, los medios acuosos estériles se pueden emplear son bien conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación de la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se va a tatar. La persona responsable de la administración determinará, en cada caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración humana las preparaciones deberían cumplir las convenciones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que requieran los gobiernos de los países en los que se van a utilizar las composiciones.

Las composiciones desveladas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables (formadas con el grupo amino libre de las proteínas) y que se forman con ácidos inorgánicos son, por ejemplo, del ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como el acético, oxálico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo también se pueden derivar de bases inorgánicas, tales como el sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Al formularlas, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tal como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, excipientes, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquiera medio convencional o agentes sea incompatible con el principio activo, su uso en las composiciones terapéuticas está contemplado. Los principios activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

La frase "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o similar cuando se administra a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contienen una proteína como principio activo se entiende bien en la técnica. Normalmente dichas composiciones se preparan como inyectables, sea en soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución, o la suspensión, en un líquido antes de la inyección.

C. Tratamientos de combinación

Los compuestos y procedimientos de la presente divulgación se pueden utilizar en el contexto de enfermedades/afecciones que incluyen el cáncer y la aterosclerosis. Con el fin de aumentar la eficacia de un tratamiento con las composiciones de la presente invención, tal como un rhabdovirus, puede que sea deseable combinar estas composiciones con otros agentes eficaces en el tratamiento de las enfermedades y afecciones. Por ejemplo, el tratamiento de un cáncer se puede implementar con compuestos terapéuticos de la presente invención y otras terapias anticáncer, tales como agentes anticáncer o cirugía.

Se pueden emplear distintas combinaciones; por ejemplo, un rhabdovirus no VSV, tal como el virus Maraba, virus Carajas, virus Muir Springs, y/o virus Bahía Grande, es "A" y la terapia anticáncer secundaria es "B", que puede incluir un segundo rhabdovirus:

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

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

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

La administración de un virus terapéutico o construcciones víricas e la presente invención a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de esa terapia secundaria particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si existe, del tratamiento vírico. Si se espera que los ciclos de tratamiento se repetirían según fuera necesario. también se contempla que distintas terapias convencionales, así como la intervención quirúrgica se puede aplicar en combinación con la terapia de células cancerosas o tumorales descrita.

1. Terapia anticáncer

Un agente "anticáncer" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo las células cancerosas, induciendo la apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia o número de metástasis, reduciendo el tamaño tumoral, inhibición del crecimiento tumoral, reducción del suministro sanguíneo a un tumor o células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra las células cancerosa o un tumor, evitar o inhibir la progresión del cáncer, o aumentar la supervivencia de un sujeto con cáncer. Los agentes anticáncer incluyen agentes biológicos (bioterapia), agentes quimioterápicos, y agentes radioterápicos. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad eficaz combinada para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células con el virus o construcción vírica y los agentes o factores múltiples al mismo tiempo. Esto se puede conseguir poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en el que una composición incluye el virus y el otro incluye el segundo agente(s).

La resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterápicos y radioterápicos representan un problema principal en la oncología clínica. Un objetivo de la investigación actual contra el cáncer es encontrar maneras para mejorar la eficacia de la quimio y radioterapia combinándolas con la terapia genética. Por ejemplo, el gen de la timidina cinasa (HS-tK) del herpes simple, cuando se suministra a tumores cerebrales mediante el sistema de vector retrovírico, se inducía satisfactoriamente una susceptibilidad al agente antivírico ganciclovir (Culver y col., 1992). En el contexto de la presente invención, se contempla que la terapia con poxvirus se podría utilizar de manera similar en conjunción con una intervención quimioterapéutica, radioterapéutica, inmunoterapéutica, u otras biológicas, además de otros agentes reguladores del ciclo celular o pro-apoptóticos.

De manera alternativa, la terapia vírica puede preceder o seguir al otro tratamiento en intervalos que varían desde minutos a semanas. En realizaciones en las que el otro agente y el virus se aplican por separado a la célula, se aseguraría en general que no expire un periodo de tiempo significativo entre el tiempo de cada suministro, de manera que el agente y el virus seguirían siendo capaces de ejercer ventajosamente un efecto combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 h entre ellas y, más preferentemente, dentro de aproximadamente 6-12 h entre ellas. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, sin embargo, de un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

a. Quimioterapia

Las terapias del cáncer incluyen una variedad de terapias de combinación con tratamientos basados en químicos y radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazina, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, busulfan, nitrosourea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, etopósido (VP 16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor estrogénico, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina, y metotrexato. Temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier variante análoga o derivada de los anteriores. La combinación de quimioterapia con terapia biológica se conoce como bioquimioterapia.

b. Radioterapia

Otros factores que causan un daño del ADN y que se han utilizado extensamente incluyen los que se conocen comúnmente como rayos γ, rayos X, haces de protones, y/o suministro dirigido de radioisótopos a las células tumorales. Otras formas de factores de daño del ADN también se contemplan tal como microondas y radiación UV. Es más probable que todos estos factores efectúen un amplio intervalo de daños sobre el ADN, sobre los precursores de ADN, sobre la replicación y reparación de ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosificación varían para los rayos X desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos de tiempo prolongados (3 a 4 sem), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y tipo de radiación emitida y la captación por las células neoplásicas.

Las expresiones "puestos en contacto" y "expuestos", cuando se aplican a una célula, se utilizan en el presente documento para describir el proceso por el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterápico o

radioterápico se suministran en una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la destrucción o estasis celular, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad eficaz combinada para destruir la célula o evitar que se divida.

c. Inmunoterapia

La inmunoterapia, en general, se basa en el uso de células inmunitarias y moléculas efectoras para dirigirse y destruir las células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador de la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar actualmente la destrucción celular. El anticuerpo se puede conjugar también con un fármaco o toxina, (quimioterápico, radionúclido, cadena A de ricino, toxina colérica, toxina pertussis, etc.) y sirve simplemente como agente de direccionamiento. De manera alternativa, el efector puede ser un linfocito que tiene una molécula de superficie que interactúa sea directa o indirectamente, con una célula tumoral diana. Distintas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK. La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, actividad citotóxica directa e inhibición o reducción de ciertos rhabdovirus o polipéptidos de rhabdovirus proporcionarían un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer.

La inmunoterapia también se puede utilizar como parte de una terapia combinada. La estrategia general para la terapia combinada se expone posteriormente. En un aspecto de la inmunoterapia. La célula tumoral debe tener algún marcador que sea posible direccionar, es decir que no esté presente en la mayoría de otras células, existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen el antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno sialil de Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor estrogénico, receptor de laminina, erbB y p155. Los lisados de células tumorales también se pueden utilizar en la composición antigénica.

Un aspecto alternativo de la quimioterapia es combinar los efectos anticáncer con los efectos inmunoestimulantes. Las moléculas inmunoestimulantes incluyen: citocinas tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, IFNγ, quimiocinas tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento tales como el ligando FLT3. La combinación de moléculas inmunoestimulantes sea como proteínas o utilizando el suministro genético en combinación con un supresor tumoral se ha demostrado que aumenta los efectos antitumorales (Ju y col., 2000).

Como se ha expuesto anteriormente, los ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son adyuvantes inmunitarios (por ejemplo, Mycobacterium bovis, Plasmodium falciparum, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos) (Patentes de EE. UU. 5.801.005 y 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides y col., 1998), terapia con citocinas (por ejemplo, interferones α, β y γ; IL-1, GM-CSF y TNF) (Bukowski y col., 1998; Davidson y col., 1998; Hellstrand y col., 1998); terapia genética (por ejemplo, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin y col., 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; Patentes de EE. UU. 5.830.880 y 5.846.945) y anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anti-ganglιósido GM2, anti-HER-2, anti-p185) (Pietras y col., 1998; Hanibuchi y col., 1998; Patente de EE. UU. 5.824.311). El herceptin (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal quimérico (de ratón-humano) que bloquea el receptor HER2-neu (Dillman, 1999). La terapia de combinación del cáncer con herceptin y quimioterapia ha demostrado que es más eficaz que las terapias individuales. Por lo tanto, se contempla que se pueden emplear una o más terapias anticáncer con las terapias relacionadas con rhabdovirus descritas en el presente documento.

(1) Inmunoterapia pasiva

Existen varias estrategias diferentes para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Se pueden categorizar ampliamente en los siguientes: inyección de anticuerpos solos, inyección de anticuerpos acoplados a toxinas o agentes quimioterápicos; inyección de anticuerpos acoplados a isótopos radioactivos; inyección de anticuerpos anti-idiotípico; y finalmente, la purga de las células tumorales en la médula ósea.

Preferentemente, se emplean los anticuerpos monoclonales humanos en la inmunoterapia pasiva, ya que producen pocos efectos secundarios o ninguno en el paciente. Sin embargo, su aplicación está limitada de alguna manera por su escasez y hasta ahora solo se han administrado por vía intralesional. Los anticuerpos monoclonales humanos contra los antígenos gangliósidos se han administrado por vía intralesional a pacientes que padecen melanoma cutáneo recurrente (Irie y Morton, 1986). Se observó una regresión en seis de los diez pacientes, a continuación de inyecciones diarias o semanales. En otro estudio, se consiguió un éxito moderado con inyecciones intralesionales de dos anticuerpos monoclonales humanos (Irie y col., 1989).

Puede ser favorable administrar más de un anticuerpo monoclonal dirigido contra dos diferentes antígenos o incluso anticuerpo con múltiple especificidad de antígeno. Los protocolos de tratamiento también pueden incluir la administración de linfocinas u otros amplificadores inmunitarios como se describe por Bajorin y col. (1988). El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos se describe con más detalla en la memoria descriptiva.

(2) Inmunoterapia activa

En la inmunoterapia activa, se administra un péptido, polipéptido o proteína antigénicos, o una composición celular tumoral alogénica o autóloga o “vacuna”, en general con un adyuvante bacteriano distintivo (Ravindranath y Morton,

1991; Morton y col., 1992; Mitchell y col., 1990; Mitchell y col., 1993). En la inmunoterapia del melanoma, los pacientes que daban lugar a una alta respuesta de IgM a menudo sobrevivían mejor que los que no daban lugar o daban lugar a pocos anticuerpos IgM (Morton y col., 1992). Los anticuerpos IgM a menudo son anticuerpos transitorios y la excepción a la regla parece ser los anticuerpos anti-gangliósidos o anticarbohidratos.

(3) Inmunoterapia adoptiva

En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos circulantes del paciente, o los linfocitos infiltrados en el tumor, se aíslan *in vitro*, se activan con citocinas tales como la IL-2 o se transducen con genes de necrosis tumoral y se vuelven a administrar (Rosenberg y col., 1988; 1989). Para conseguir esto, se administraría a una animal o paciente humano una cantidad inmunológicamente eficaz de linfocitos activados en combinación con una composición peptídica antigénica con adyuvante incorporado como se describe en el presente documento. Los linfocitos activados serán más preferentemente células propias del paciente que se aislaron anteriormente de una muestra de sangre o del tumor y se activan (o "expanden") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y carcinoma renal, pero el porcentaje de los que responden era menor en comparación con los que no responden.

d. Genes

En otro ejemplo más, el tratamiento secundario es una terapia genética en la que un polinucleótido terapéutico se administra antes, después o al mismo tiempo que se administra un rhabdovirus. El suministro de un rhabdovirus en conjunción con un vector que codifica uno de los siguientes productos genéticos tendrán un efecto anticáncer combinado en los tejidos diana. De manera alternativa, el rhabdovirus puede modificarse como un vector vírico para incluir el polinucleótido terapéutico. Se engloban dentro de la invención una variedad de proteínas, algunas de las cuales se describen posteriormente. La Tabla 4 enumera distintos genes que pueden dirigirse para la terapia genética de alguna forma en combinación con la presente invención.

(1) Inductores de la proliferación celular

Las proteínas que inducen una proliferación celular se encuentran adicionalmente en distintas categorías dependiendo de la función. Lo que tienen en común todas estas proteínas es su capacidad para regular la proliferación celular. Por ejemplo, una forma de PDGF, el oncogén sis, es un factor de crecimiento secretado. Los oncogenes raramente aparecen a partir de genes que codifican factores de crecimiento, y actualmente, sis es el único factor de crecimiento oncogénico de origen natural conocido. En un aspecto de la presente divulgación se contempla que el ARNm antisentido dirigido a un inductor particular de proliferación celular se utiliza para evitar la expresión el inductor de proliferación celular.

(2) Inhibidores de proliferación celular

Los oncogenes supresores de un tumor funcionan para inhibir la proliferación celular excesiva. La inactivación de estos genes destruye su actividad inhibidora, dando como resultado una proliferación sin regular. Los supresores tumorales incluyen p53, p16 y C-CAM. Otros genes que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención incluyen Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zacl, p73, VHL, MMAC1 / PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, fusiones p27/p16, fusiones p21/p27, genes antitrombóticos (por ejemplo, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fins, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, genes implicados en la angiogénesis (por ejemplo, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF, o sus receptores) y MCC.

(3) Reguladores de la muerte celular programada

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal. Mantenimiento de la homeostasis en tejidos adultos, y supresión de la carcinogénesis (Kerr y col., 1972). La familia Bcl-2 de proteínas y proteasas tipo ICE se ha demostrado que son reguladores importantes y efectores de apoptosis en otros sistemas. La proteína Bcl-2, descubierta en asociación con el linfoma folicular, tiene un papel importante en el control de la apoptosis y aumento de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi y col., 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary y col., 1986; Tsujimoto y col., 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). La proteína Bcl-2 evolucionariamente conservada se reconoce ahora como un miembro de una familia de proteínas relacionadas que puede categorizarse como agonistas de muerte o antagonistas de muerte.

Como consecuencia de su descubrimiento, se ha demostrado que la Bcl 2 actúa para suprimir la muerte celular desencadenada por una variedad de estímulos. También es aparente ahora que hay una familia Bcl 2 de proteínas reguladoras de la muerte celular que comparen homologías estructurales y de secuencia. Se ha demostrado que estos miembros de la familia diferentes poseen funciones similares a la Bcl 2 (por ejemplo, BclXL, BclW, BclS, Mcl-1, A1, Bfl-1) o actúan contra la función de Bcl 2 y promueven la muerte celular (por ejemplo, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

e. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de personas con cáncer se someterá a cirugía de algún tipo, lo que incluye cirugía

preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa o paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que se puede utilizar en conjunción con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente divulgación, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia genética, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

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

Con la escisión de parte de todas las células cancerosas, tejido o tumor, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede conseguir por perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anticáncer adicional. Dicho tratamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos también pueden tener dosificaciones variables.

f. Otros agentes

Se contempla que se pueden utilizar otros agentes en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación positiva de los receptores de superficie celular y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos, u otros agentes biológicos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón α, β y γ; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas; o MIP-1, MIP-1p, MCP-1, RANTES, y otras quimiocinas. Se contempla adicionalmente que la regulación positiva de receptores de superficie celular o sus ligandos tales como el ligando Fas/Fas, DR4 o DR5/TRAIL (ligando Apo-2) potenciaría la capacidad inductora de apoptosis de la presente invención por el establecimiento de un efecto autocrino o apocrino de células hiperproliferativas. Los aumentos de la señalización intercelular elevando el número de uniones GAP aumentaría los efectos anti-hiperproliferativos en la vecindad de la población de células hiperproliferativas. En otros aspectos, los agentes citostáticos o de diferenciación se pueden utilizar en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia anti-proliferativa de los tratamientos. Los inhibidores de la adhesión celular se contemplan para aumentar la eficacia de la presente invención. Ejemplos de inhibidores de adhesión celular son los inhibidores de cinasa de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contemplan adicionalmente otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, que se podrían utilizar en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento.

Ha habido muchos avances en la terapia del cáncer siguiendo la introducción de fármacos quimioterápicos. Sin embargo, una de las consecuencias de la quimioterapia es el desarrollo/adquisición de fenotipos resistentes a los fármacos y el desarrollo de resistencias multi-fármacos. El desarrollo de la resistencia a fármacos sigue siendo un obstáculo principal en el tratamiento de dichos tumores y, por lo tanto, hay una necesidad obvia de estrategias alternativas tales como la terapia vírica.

Otra forma de terapia para su uso en conjunción con la quimioterapia, terapia por radiación y terapia biológica incluye la hipertermia, que es un procedimiento en el que el tejido del paciente se expone a altas temperaturas (hasta de 41 ºC). los dispositivos de calentamiento externos o internos pueden implicarse en la aplicación de hipertermia local, regional, o del cuerpo completo. La hipertermia local implica la aplicación de calor en un área pequeña, tal como un tumor. El calor puede generarse externamente con ondas con alta frecuencia que se dirige a un tumor desde un dispositivo fuera del cuerpo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, que incluyen cables finos calentados o tubos huecos rellenos con agua caliente, antena de microondas implantadas, o electrodos de radio frecuencia.

El órgano o una extremidad de un paciente se calienta por terapia regional, que se consigue utilizando dispositivos que producen alta energía, tal como imanes. De manera alternativa, algo de sangre del paciente se puede retirar y calentar antes de perfundirla en el área que se calentará internamente. El calentamiento de sangre completa se puede implementar también en los casos donde el cáncer se ha diseminado a través del cuerpo. Se pueden utilizar mantas de agua caliente, cera caliente, bobinas inductoras y cámaras térmicas para este fin.

También se puede utilizar terapia hormonal en conjunción con la presente divulgación o en combinación con cualquier otra terapia del cáncer descrita previamente. El uso de hormonas se puede emplear en el tratamiento de ciertos cánceres tales como un cáncer de mama, próstata, ovárico, o de cuello uterino para disminuir el nivel o bloquear los efectos de ciertas hormonas tales como testosterona o estrógenos. El tratamiento a menudo se utiliza en combinación con al menos una terapia de cáncer como tratamiento.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan con el fin de ilustrar distintos aspectos de la divulgación y no significa que limitan la presente divulgación de ninguna manera. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente divulgación

se adapta mejor para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionadas, así como los objetivos, fines y ventajas inherentes a ellas. Los presentes ejemplos, junto con los procedimientos descritos en el presente documento son actualmente representativos de aspectos preferidos, son ejemplares, y no pretenden ser limitantes del ámbito de la divulgación.

Ejemplo comparativo 1

EXPLORACIÓN DE NUEVOS RHABDOVIRUS ONCOLÍTICOS CANDIDATOS

Exploraciones *in vitro*. Como una exploración inicial para identificar nuevos virus oncolíticos, rhabdovirus de campo aislados se evaluaron en cuanto a su capacidad para destruir células tumorales humanas del panel celular NCI60. Esto fue una estrategia fructífera para los inventores en el pasado para determinar la eficacia relativa de una serie de VSV mutantes como oncolíticos candidatos (que lisan células cancerosas). Inicialmente los inventores han examinado 13 nuevos rhabdovirus que se había determinado anteriormente que se replicaba en células de mamífero. Se contempla que este procedimiento se extendiera para estudiar los rhabdovirus para los cuales hay menos experiencia en cultivo celular. En un esfuerzo para explorar rápida y eficazmente mediante una matriz de 60 células infectadas con 13 virus diferentes, los inventores utilizando un ensayo rápido y barato en un formato de 96 pocillos utilizando la reducción de MTS formazan, o tinción con cristal violeta de las células residuales, para medir el número celular y la viabilidad. Los inventores cultivaron las líneas celulares a un 80 % de confluencia en placas de 96 pocillos y entonces se expusieron en paralelo a los aislados de rhabdovirus de campo de los inventores aumentando las MOI (Moi = 0,0001 – 10 UFP/célula). A las 48 y 96 horas después de la infección, se tiñeron las células con el reactivo MTS acuoso (Promega USA) y se incubaron durante 3 horas para permitir la suficiente formación de formazan. De manera alternativa, las placas de células infectadas se lavaron con tampón para retirar las células muertas, se tiñó con un colorante de cristal violeta, se lavaron para retirar el colorante residual, después de cuyo tiempo se solubilizó el colorante utilizando un detergente. Estas placas se leyeron entonces utilizando un lector de placas multipocillo integrado (Biotek SynergyHT; USA), se ajustó la curva de datos, y se determinó la CE_{50} de esta curva. Normalmente, los ensayos se llevaron a cabo por sextuplicado, con retirada del valor más alto y el más bajo de la CE_{50}, y promediando las restantes CE_{50} para determinar en último término y valor y un intervalo de confianza (por ejemplo, véase la FIG. 2).

Como marcador para evaluar si un virus particular infecta/destruye células humanas normales *in vitro*, se explorarán cultivos de fibroblastos humanos normales, cultivos de epitelio y endotelio y neuronales de la colección de los inventores y los disponibles en el mercado (Cambrex. USA). Los cultivos se infectarán con los virus candidatos (0,1 a 20 ufp/célula) durante 48 y 96 horas. Se detectará la viabilidad celular mediante el ensayo con MTS, o el ensayo con cristal violeta, y se caracterizó adicionalmente marcándolo con anticuerpo D175 caspasa 3 activado (Cell Signaling Technologies, USA) y se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los estudios se harán en paralelo con líneas tumorales humanas y de ratón susceptibles /resistentes conocidas. Se ha utilizado una combinación de células no tratadas y células tratadas con TRAIL y ciclohexamida para establecer el rango dinámico del ensayo, con determinaciones preliminares de factor z significativamente por encima de 0,5.

Otra contingencia es que los virus se puedan replicar y diseminar eficazmente en los cultivos sin destruir rápidamente estas células. Hay también virus potencialmente interesantes, a condición de que su replicación sea selectiva del tumor en la naturaleza, ya que su capacidad lítica se podía aumentar posteriormente mediante modificación recombinante. Para detectar estos virus, los inventores infectaran células del panel celular del NCI 60 con aislados de campo a una MOI baja (0,1 ufp/célula) en pocillos duplicados de una placa de 24 pocillos. Después de una hora, se lavaron los pocillos completamente para retirar los virus introducidos libres, se añadió medio y se incubaron los cultivos durante 72 horas adicionales. Estos sobrenadantes del cultivo se titularon posteriormente sobre una línea celular permisiva (células Vero) para detectar y cuantificar la infección productiva. El lavado final de cada uno de estos se tituló para controlar los virus de entrada residuales. Los virus candidatos superiores en este ensayo se confirmaron en células de cultivo tisular utilizando un antisuero específico del virus y microscopía de fluorescencia convencional.

Clasificación basada en todos los parámetros. Varias propiedades contribuyen a la destrucción oncolítica de las células tumorales incluyendo: la capacidad para inducir apoptosis, la tasa de producción vírica, la cuantificación del virus producido, así como las funciones especiales, tales como la formación sincitial. Los candidatos prometedores de la exploración inicial se caracterizaron adicionalmente con respecto a la inducción de apoptosis (como sed determinó por el ensayo TUNEL (la tinción inmunofluorescente por la caspasa-3 activada), y curvas de crecimiento de una etapa para comparar las cinéticas y cuantificar la producción de virus. Estos estudios sirven como guía para mejorar estas cepas. Por ejemplo: (1) si un virus destruye bien las célula tumorales pero presenta una toxicidad inaceptable para las células normales, los inventores atenuaban este virus utilizando una o más de las estrategias señaladas posteriormente; (2) de manera alternativa, si un virus muestra cinéticas de destrucción más lentas mientras mantiene una alta tasa de replicación, entonces los inventores pueden añadir un tóxico o transgén terapéutico; (3) Si un virus candidato se replica lentamente aunque es un destructor eficaz, el inventor seleccionará una variante con cinéticas de crecimiento aumentadas para reforzar su potencia.

Por la experiencia de los inventores con VSV y otros virus oncolíticos, han identificado tres criterios de regulación claves *in vitro* para estrechar la lista de candidatos: (1) destrucción celular tumoral selectiva, (2) replicación

productiva dentro de las células tumorales (independiente de la destrucción), y (3) eficacia en líneas tumorales resistentes a VSV (UACC-62 de melanoma, A431 y NCI-H226 de pulmón, DU-145 de próstata, HL60 de leucemia). Basándose en estos criterios, los resultados de los ensayos de exploración descritos anteriormente se integrarán para recortar la lista para la evaluación adicional en ensayos *in vivo* preliminares.

Toxicidad y biodistribución *in vivo*. Las dos vías de administración relacionadas con un cuadro clínico son inyecciones intravenosas (IV) e intracraneales (IC). Los candidatos de cabeza identificados durante la exploración *in vitro* de toxicidad y biodistribución en ratones después de la infección se evaluaron por estas vías. Los grupos de 3 ratones se infectaron por vía IV a dosis de 1 x 10^5 a 1 x 10^9 ufp, o por IC a 1 x 10^2 a 1 x 10^6 ufp. Además de la mortalidad, se monitorizará la morbilidad diariamente en cuanto a signos de letargia, deshidratación, pérdida de peso y parálisis de extremidades. La histopatología se llevó a cabo en 2 ratones del grupo de dosis letal mínima (máxima dosis sin alcanzar la dosis letal) de cada infección de virus candidato. El VSV WT y la infección falsa sirve como controles positivo y negativo apropiados, respectivamente. Los órganos se recolectaron de los restantes ratones de este grupo, se homogeneizaron y se titularon como evaluación preliminar de la biodistribución vírica.

Para los virus que presentan un intervalo de dosis letal aceptable, los inventores evaluaron posteriormente la biodistribución en ratones que albergaban un tumor para identificar virus compatibles con la administración sistémica. El inventor emplea tres de los modelos de cáncer existentes del inventor que representan órganos diana muy diferentes de relevancia clínica crítica: (1) carcinoma de colon de ratón CT-26 (1 x 10^5 células) por inyección intravenosa para formar tumores pulmonares diseminados en ratones Balb/C singénicos (2), carcinoma de mama 4T1 de ratón (4 x 10^5 ´células) inyectadas en la almohadilla grasa der ratones Balb/C singénicos para formar un único tumor primario con metástasis espontánea, y (3) células de glioblastoma humano U87 (1 x 10^5 células) implantadas estereotáticamente en el córtex de ratones atímicos. Se determinó una dosis máxima tolerable para cada virus y vía (IV o IC) a partir de los experimentos de toxicidad preliminares *in vivo*. Este valor sirve como una dosis terapéutica inicial para los estudios de biodistribución en ratones que albergan un tumor. En los grupos de 3 ratones, se establecieron los tumores durante una semana y entonces se trataron por vía IV o IC con una única dosis de cada virus candidato a su respectiva MTD. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento, se perfundieron los animales con solución salina para aclarar cualquier virus libre de la circulación y se recolectaron los tumores y los órganos, se homogeneizaron y se titularon para cuantificar los virus infecciosos. De esta manera, los inventores determinaron que virus se suministrarían en los sitios tumorales por inyección sistémica, así como la selectividad tumoral relativa de la replicación del virus *in vivo*.

Reclasificación. Basándose en la toxicidad, biodistribución, suministro sistémico y perfiles de selectividad tumoral en los estudios *in vivo*, los inventores seleccionaron los mejores candidatos para proceder con la caracterización detallada y el desarrollo posterior.

Ejemplo comparativo 2

CONSTRUCCIONES RECOMBINANTES

Sistema de secuenciación y recombinante. Con el fin de facilitar la investigación y desarrollo rápidos, la producción posterior de material clínico y para asegurar la seguridad y estabilidad de los virus terapéuticos, los inventores clonaron y rescataron formas recombinantes de virus seleccionados.

Muchos ssARN virus con cadena negativa se han clonado y rescatado utilizando técnicas recombinantes convencionales. Los inventores emplearon estrategias similares que se habían adoptado satisfactoriamente para los virus recombinantes -ssARN conocidos. En resumen, el genoma de un virus candidato se aísla mediante extracción de ARN (Qiagen Corp) a partir de 1 x 10^9 partículas víricas purificadas. El ARN genómico purificado se ceba entonces con hexámeros aleatorios y se transcribe inversamente a ADNc, que se hace posteriormente de doble cadena y se clona ligando adaptadores EcoRI, se fracciona por tamaño y finalmente se liga en un plásmido bacteriano digerido con EcoRI (pT7Blue; Novagen). El resultado es una biblioteca de fragmentos genómicos que se pueden secuencias fácilmente por técnicas convencionales. Debido a la naturaleza de cebado aleatorio de esta biblioteca, esta estrategia no “captura” el extremo 3 y los extremos 5’. Para hacer esto los inventores ligaron oligos en los extremos 3’ o 5’ del ARN genómico purificado utilizando una ARN ligasa T4. Utilizando los cebadores complementarios para el oligo ligado recientemente que flanquea el genoma, los inventores amplificaron por PCR y clonaron los extremos del genoma para la secuenciación posterior. Esta información de secuencias se utilizó entonces para diseñar cebadores específicos del extremo para amplificar el genoma completo, que se clonó entonces en un plásmido especializado. Este plásmido flanquea el genoma con un promotor T7 en un extremo y una ribozima que auto escinde el delta de hepatitis y una secuencia terminadora T7 en el flanco opuesto. Cuando se transfectan en células A549 que expresan ARN polimerasa T7 (previamente infectadas con un virus vaccinia que expresa T7), este plásmido genera genomas víricos en el citoplasma. En paralelo, las secuencias codificantes de los virus para los genes N, P y L se clonaron en plásmidos de expresión dirigidos por el promotor CMV. La co-transfección de la construcción del genoma con los plásmidos N, P y L en estas células A549 reconstituye el complejo de replicación vírica en el genoma vírico y da como resultado el rescate de virus infecciosos. Como una prueba del principio, los inventores han cuando, modificado genéticamente, y rescatado el virus Maraba utilizando este procedimiento. Véase la FIG. 17 y FIG. 18 para ejemplos de virus relacionados con el Maraba.

Ejemplo comparativo 3

OPTIMIZACIÓN/AUMENTO

Los rhabdovirus no VSV son virus silvestres; y como todos los virus oncolíticos informados hasta hora, incluyendo el VSV, los inventores predicen que estos aislados de campo se benefician de una optimización posterior mediante la selección *in vitro* y/o estrategias de modificación recombinante. Algunos candidatos pueden necesitar una atenuación (por ejemplo, el virus Maraba) mientras que algunos necesitan un aumento de sus cinéticas replicación y/o destrucción tumoral (por ejemplo, el virus Muir Springs). A continuación, está un sumario de varias estrategias que los inventores emplean para maximizar la eficacia de los virus terapéuticos recién identificados.

Mutaciones modificadas. El VSV bloquea el transporte de ARNm nuclear/citoplasmático como un medio para derrotar la inmunidad innata de la célula huésped. Los inventores habían descrito anteriormente mutaciones modificadas en la proteína M de VSV para incapacitar esta actividad y de esta manera atenuar selectivamente este virus en células normales. Dado que otros miembros del género vesiculovirus también han demostrado esta capacidad (Chandipura, y viremia de primavera de la carpa) y que la mayoría de los vesiculovirus secuenciados hasta ahora (VSV, Chandipura, Piry, Cocal, viremia de primavera de la carpa, Maraba) tienen el motivo de secuencia crítico necesario para esta función del VSV, los inventores contemplaron atenuar los rhabdovirus no VSV de una manera análoga a la que se utiliza para VSV. Sin embargo, otros rhabdovirus tales como el virus de rabia y de la fiebre efímera bovina no tienen este motivo y no bloquean el transporte de ARNm nuclear/citoplásmico y quizá no son propensos a esta estrategia de atenuación. Según haya disponible más información con respecto a la interacción rhabdovirus/huésped de los laboratorios del consorcio y otros, serán posibles modificaciones adicionales guiadas a la estructura/funcionalidad para atenuar estos virus.

Transgenes. Existen ahora varios informes de “armado” de virus oncolíticos con genes suicidas o mediadores inmunitarios para aumentar su potencia. Los inventores se enfocaron en la adición de transgenes para aumentar la citotoxicidad de los virus candidatos que pe sentaban una replicación eficaz, por insuficiente destrucción tumoral. Los inventores han sopesado la prioridad de la lista de transgenes que se van a modificar actualmente en el virus Maraba. En este momento, la clasificación consiste en: (19 factor e inducción de apoptosis (AIF) – un homologa de la oxido reductasa responsable del colapso y degradación de la cromatina de una manera independiente de la caspasa. (2) Harakiri – el miembro pro-apoptótico más potente solo de BH3 de la familia Bcl- responsable de la inducción de apoptosis dependiente de caspasa convencional (Tipo I PCD). (3) XAF1 – un potente gen supresor tumoral e inhibidor directo de la familia IAP. (4) Atg4B – la proteasa clave responsable del inicio de la autofagia (Tipo II PCD).

En último término, los miembros de las rutas intrínseca o extrínseca de la muerte celular se podrían modificar con Tat u otro dominio de transducción proteica para secretarse de las células infectadas con el virus para inducir un testigo de destrucción dentro de la más del tumor. Los inventores siguen siendo conscientes de otros efectos de testigo de destrucción pueden mediarse a través de la inmunidad del huésped contra el virus y/o el tumor. Por lo tanto, una estrategia alternativa sería modificar un transgén, para llevar células a los sitios de la infección. Las pruebas indican que la infección vírica de tumores CT26 de pulmón inducen la infiltración de neutrófilos en el tumor y producen un efecto de destrucción por testigo apoptótico masivo.

Evolución dirigida para mejorar los rhabdovirus oncolíticos. Se han descrito muchos ejemplos de evolución dirigida en los que la fuerza de la replicación de una cepa vírica parental se aumentaba o disminuía mediante pasajes en serie en un cultivo de células de mamífero. Los rhabdovirus son particularmente proclives a este tipo de procedimientos ya que no existente como una entidad única, sino como una población de cepas llamadas cuasi-especies. Los miembros de las cuasi-especies representan mutaciones puntuales del genoma dominante. Cuando se aplica una apropiada presión de selección, el miembro más válido de la población se selecciona, y se convierte en el genoma dominante. Esto tiene una tremenda utilidad en los esfuerzos para construir un virus oncolítico mejor debido a que proporciona una colección de mutantes fáciles de hacer de los que se selecciona una variante con las mejores capacidades oncolíticas. Por lo tanto, para atenuar un determinado candidato, los inventores seleccionaron mutantes de placa pequeña en fibroblastos primarios y posteriormente amplificaron el virus clonado en células tumorales para retro seleccionar las mutaciones no productivas (es decir, mutaciones que se debilitan uniformemente, tal como mutaciones de polimerasa, al contrario, a las discapacidades específicas en células/tejidos normales). Llevando a cabo esto en ciclos repetidos a altas MOI (10 ufp/célula), lo inventores esperan aislar un mutante que mantenga una robusta replicación en células tumorales, aunque hayan perdido la capacidad para infectar productivamente células sanas normales. De manera alternativa, los inventores pueden aumentar la potencia de rhabdovirus no VSV, por selección de replicadores más rápidos, o destructores más letales. Para acelerar la tasa de replicación de un virus candidato, los inventores llevaron a cabo rondas repetidas de infección/replicación en líneas celulares tumorales, pero en cada ronda siguiente disminuía el tiempo de recolección tras la infección. Esta presión de selección fuerza a los virus a evolucionar hacia la replicación rápida. Si se deseara aumentar la citotoxicidad, los inventores infectaron líneas celulares tumorales resistentes o recalcitrantes (1×10^6 células) con virus candidatos (MOI = 1). Las células vivas se tiñeron posteriormente con colorante vital JC1 para detectar eventos de apoptosis precoz mediante citometría de flujo de color dual. Las células que sufrían apoptosis se clasificaron en monocapas de células Vero para recuperar el virus que se replicaba dentro de ellas. Las rondas repetidas de este ensayo, de nuevo con disminución del tiempo de recolección, selecciona un fenotipo más

rápidamente letal. Los virus mejorados de esta manera se secuencian para mapear las alteraciones genéticas y que contribuyen a los esfuerzos del análisis de estructura/función de los inventores hacia un mejor entendimiento de la biología de los rhabdovirus y la oncólisis. El panel genético inverso permite una estrategia sin tendencia para mejorar rhabdovirus y representa un buen complemento a los esfuerzos para hacer mejoras mediante modificación recombinante de los transgenes o las mutaciones racionales basadas en los estudios de estructura/función.

Ejemplo 4

ENSAYO *IN VIVO* DE NUEVOS RHABDOVIRUS ONCOLÍTICOS RECOMBINANTES

Los inventores han escogido el uso de modelos ortotópicos de cáncer ya que recapitulan con más precisión la enfermedad clínica humana. Sin embargo, a diferencia de los modelos de tumor subcutáneo, los tumores ortotópicos no son fácilmente accesibles y por lo tanto difíciles de evaluar sin sacrificar al animal de experimentación. Para resolver este problema, se adoptó una tecnología de creación de imágenes ópticas multimodal que permite la creación de imágenes no invasiva y la medición repetida del crecimiento y regresión de los tumores implantados, así como el desarrollo y regresión de las lesiones metastáticas distales. Los inventores tienen una plataforma altamente sensible completamente integrada de creación de imágenes completas del animal (IVIS 200; Xenogen Corp) que pueden detectar fotones emitidos incluso desde dentro del tejido profundo. Puede medir luz fluorescente emitida por proteínas fluorescentes recombinantes tales como GFP, así como detectar la bioluminiscencia generada por luciferasa. Utilizando genes indicadores de luciferasa específicos del sustrato, uno expresado desde el virus y el otro expresado desde las células tumorales, los inventores pueden medir la bioluminiscencia resultante de la replicación vírica de manera concurrente con las mediciones tumorales. Para hacer esto los inventores han clonado o YFP o una nueva RFP monomérica en fase con luciferasa de luciérnaga o una luciferasa tipo renilla nueva del copépodo marino *Gaussia princeps*. Entre estas dos secuencias codificantes los inventores han modificado una secuencia de "parada-reinicio" de 30 aminoácidos. Este pequeño motivo viene del virus de la enfermedad del pie y la boca y permite la expresión estequiométrica de dos proteínas a partir de un único ARNm, es muy pequeño y no sufre por la variabilidad de célula a célula como los motivos de un IRES. Estas construcciones indicadoras duales se clonaron en vectores de lentivirus, se empaquetaron en el virus, y se utilizaron para establecer unas células 4T1, CT26 y U87 de glioblastoma humano marcadas con un indicador estable. Estas líneas celulares se utilizaron en tres modelos de tumor ortotópico en ratón: las U87 de glioma humano implantadas por vía intracraneal en ratones atímicos CD-1; células 4T1 de carcinoma de mama de ratón implantadas en la almohadilla grasa de hembras Balb/c (modelo de enfermedad metastática agresiva); las CT-15 e carcinoma de colon inyectadas en la vena de la cola de ratones Balb/C (tumores diseminados en el pulmón). La elección del modelo ortotópico se declara con los siguientes criterios: tumor de desarrollo rápido, agresivo, y por lo tanto un desafío para el tratamiento; representa muchas dianas orgánicas diferentes, abarca sistemas tanto de huéspedes inmunocompetentes como inmunocomprometidos.

Los primeros estudios son para evaluar las características de la respuesta a la dosis de los modelos de los inventores para identificar una dosis óptima. A partir de los experimentos de toxicidad preliminares, los inventores han definido una MTD para cada una de las cepas candidateas en animales Balb/C que no tenían tumor. Por lo tanto, los inventores ensayaron dosis desde la MTD, disminuyendo en intervalos de medio log hasta 1 x 10^3 ufp. Utilizando el IVIS para la replicación de imágenes en los tumores establecidos, se estudiaron las cinéticas de suministro de virus inicial y la duración de la replicación posterior en función de la dosis. En estudios paralelos los ratones se sacrificaron durante este momento y se examinaron utilizando microscopía de fluorescencia para determinar cómo afecta la dosis a la capacidad para alcanzar todas las partes del tumor y las lesiones metastáticas distales. El tejido sano se examinó para evaluar la replicación especifica en el tumor. Finalmente, se determinó la seguridad en cada dosis monitorizando los ratones por cualquier signo de morbilidad tal como pérdida de peso, deshidratación y cambios de comportamiento. Las respuestas tumorales a los virus en las comparaciones mano a mano se evaluaron a continuación de un tratamiento de dosis única IV. La sensibilidad y la naturaleza cuantitativa e la tecnología de reacción de imágenes ópticas la hace idealmente adecuada para este fin. Por lo tanto, los tumores se establecieron como se ha descrito anteriormente y se monitorizaron el crecimiento o la regresión tumorales a continuación de la dosificación con los virus y se compararon estos resultados con virus de control inactivados con UV. Basándose en un trabajo previo con VSV, se contempla que una única dosis puede no ser suficiente para una regresión completa y perdurable del tumor. Esto necesita una serie de experimentos para determinar el número más eficaz y el intervalo de dosis. En una estrategia similar a la descrita anteriormente, los inventores utilizan modelos tumorales para desarrollar estrategias de dosificación máxima eficaz. Esto se hace mientras se monitoriza el suministro de virus al tumor, la replicación, duración de la replicación en el lecho del tumor y diseminación a sitios tumorales distantes, en concierto con el crecimiento/remisión del tumor. Además, los inventores examinan la infiltración celular inmunitaria y la activación en lechos tumorales y alrededor de los ganglios linfático utilizando citometría de flujo e inmunohistoquímica como otro parámetro de la actividad oncolítica. En último término, se confirma la eficacia monitorizando estos ratones en cuanto a la supervivencia total y/o tiempo de progresión; comparando los grupos tratados con el virus con los tratados con virus inactivados con UV como control. Un ejemplo del modelo animal se puede encontrar en la FIG. 13.

Ciclo retrógrado para la optimización/aumento. Puede ser que varios ciclos de optimización y luego reensayo sean necesarios para desarrollar en último término un virus terapéutico sumamente eficaz. Por lo tanto, los inventores utilizan los resultados del ensayo *in vivo* para guiar rondas adicionales de optimización biológica y/o recombinante y luego se reensaya en los modelos tumorales.

Tabla 4. Destrucción celular mediada por rhabdovirus en el panel celular NCI 60 Las células del panel celular NCI 60 se colocaron en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 90 %. Estas células se infectaron en diluciones log con distintos rhabdorvirus como se indica. Después de 48 horas, las monocapas se lavaron, fijaron y tiñeron con cristal violeta para calificar las células viables. Los valores representan las ufp necesarias para destruir el 50 % de las células en 48 h.

.

Enfermedad maligna	Línea celular	Chandipura	Maraba	Carajas	Isfahan	Klamath	Sawgrass	VSV HR
PULMÓN NSC	A549-ATCC	≤ 10^2	≤ 10^2	10^4	10^5	≥ 10°	NE	≥ 10^6
PULMÓN NSC	EKVX	≤ 10^2	10^3		≥ 10^6			10^3
PULMÓN NSC	HOP92 NCI-	10^3	10^3		10^5			≤ 10^2
PULMÓN NSC	H226	≥ 10^6	≥ 10^6	10^4				
PULMÓN NSC	NCI-H23	≤ 10^2	≤ 10^2		≤ 10^2	10^4		≤ 10^2
MELANOMA	LOX IMVI	≤ 10^2	103	10^3				≤ 10^2
MELANOMA	M 14 SK-MEL-	10^3	≤ 10^2	10^3		≥ 10^6		10^5
MELANOMA	2 MALME	≤ 10^2	10^3					≤ 10^2
MELANOMA	3M UACC-	10^3	10^5	10^5	10^3			10^5
MELANOMA	257 UACC-	≤ 10^2	≤ 10^2	≤ 10^2	10^3			≤ 10^2
MELANOMA	62		≤ 10^2	10^3				≥ 10^6
LEUCEMIA	MOLT-4		10^3					≤ 10^2
LEUCEMIA	K-562		10^5					
	OVCAR-3							
OVÁRICA	OVCAR-4		10^3					≤ 10^2
OVÁRICA	OVCAR-8	10^3	≤ 10^2	10^5	10^4	≥ 10^6	10^4	10^3
OVÁRICA		NE	10^6	≥ 10^6	NE		NE	10^3
OVÁRICA	SK-OV-3	≤ 10^2	10^5	10^5	≥ 10°		≥ 10^6	10^4
SNC	SF-268		≤ 10^2	10^4				10^4
SNC	SF-539	≤ 10^2	≤ 10^2	10^3	10^4			10^5
SNC	SNB-19	10^3	10^4	≤ 10^2				≤ 10^2
SNC	SNB-75	10^3	10^3	NE	10^5	≥ 10^6		≤ 10^2
COLON	HT29 COLO	10^4	≥ 10^6	NE	NE		NE	10^5
COLON	205	≤ 10^2	≤ 10^2		≥ 10^6			10^3
COLON	HCT-15	10^5	10^4	10^5	≥ 10^6			10^3
COLON	SW-620	≤ 10^2	≤ 10^2	10^3	10^5			≤ 10^2
MAMA	HS 578T MDA-	≥ 10^6	≥ 10^6				≥ 10^6	10^4
MAMA	MB-435	≤ 10^2	≤ 10^2 -	≤ 10^2 -	10^3			≤ 10^2
RENAL	TK-10	≤ 10^2	10^3		10^4			10^4
RENAL	786-O	10^4	≤ 10^2	10^5	10^5			10^5
RENAL	ACHN	10^5	I0^3	10^5	> 10^6		NE	≤ 10^2
RENAL	A498	10^5	10^5	≥ 10^6				10^4

(continuación)

Enfermedad maligna	Línea celular	Chandipura	Maraba	Carajas	Isfahan	Klamath	Sawgrass	VSV HR
PRÓSTATA	**DU-145**		**≤ 10^2**		**≥ 10^6**			**≥ 10^6**
PRÓSTATA	**PC-3**		**≥ 10^6**		**NE**			**≤ 10^2**
COLON DE RATÓN	**CT26**	**≤ 10^2**	**≤ 10^2**	**≥ 10^6**	**NE**			**≤ 10^2**

Tabla 5. Comparación enfocada entre cuatro rhabdovirus. Las células del panel celular NCI 60 se colocaron en placas de 6 poclos hasta una confluencia del 90 %. Estas células se infectaron en diluciones log con distintos rhabdorvirus como se indica. Después de 48 horas, las monocapas se lavaron, fijaron y tiñeron con cristal violeta para calificar las células viables. Los valores representan las ufp necesarias para destruir el 50 % de las células en 48 h.

.

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

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

Tabla 6. Destrucción *in vitro* de células transformadas e inmortalizadas seleccionadas por los nuevos rhabdovirus. Las células se colocaron en placas de 6 pocillos y se dejaron hasta alcanzar una confluencia del 75 %. Estas células se infectaron posteriormente con cada virus con un titulo fijo. Se valoraron los cultivos visualmente en cuanto a la muerte celular después de 96 h. 4+ = 100 % obliteradas, 3+ = 75-90 % muertas, 2+ = 50 % muertas, 1+= <30 % muertas, -- = no muertas.

		Farmington	Muir Springs	Rio Grande	Ngaingan	Tibrogargan	Le Dantec	Kwatta
Ser humano	293T	++++	++++	+++	++	+		
Ratón	4T1	+	+	++	+			
Ser humano	SW620	+++	+++	+++	+			
Hámster	BHKT7	+	+++	+++	+++	+++		
Ser humano	U20S	++++	++	++++	++++			
Mono	Vero	+++	++++	+++	++++			

Ejemplo comparativo 5

RHABDOVIRUS QUIMÉRICOS

Un problema potencial con las composiciones víricas oncolíticas es el potencial de una respuesta inmunitaria en un paciente. Dicha respuesta inmunitaria puede truncar la eficacia de aplicaciones adicionales del virus oncolítico ya que una parte significativa del virus se puede neutralizar por el sistema inmunitario del paciente. Para evitar este problema sería preferible tener una pluralidad de composiciones víricas oncolíticas que sean inmunológicamente distintas. En este caso se puede aplicar un virus oncolítico diferente a un paciente para cada terapia posterior proporcionando de esta manera una actividad oncolítica sostenida que esté mínimamente afectada por la respuesta inmunitaria del huésped. En este punto, se construyeron varias composiciones víricas pseudotipadas y se ensayaron en cuanto a su capacidad para infectar células.

Par estudiar la posibilidad de la utilización de rhabdovirus oncolíticos que comprendan distintas proteínas G a partir de varios de los rhabdovirus, se construyeron distintos virus recombinantes. Cada recombinante incluía el armazón de VSV Indiana de tipo silvestre (genes N, P, M y L) a menos de que se especifique otra cosa. Además, los recombinantes incluían un gen indicador de luciferasa, sea de luciérnaga (FL) o de renilla (RL) entre el gen G y el gen L. La nomenclatura general utilizada para hacer referencia a los recombinantes es RVR_aG^x, donde RVR significa Rhabdovirus recombinante, (a) denota el origen de la proteína G o el gen tipo proteína G y (x) denota el número de versión.

RVR con proteína G de Isfahan. Se clonó un genoma de RVR en el vector pNX2VSV de manera que los sitios de restricción XhoI y NheI flanqueaban los genes G o tipo G. Se añadió la secuencia de parada inicio vírica al extremo 30 de todos los genes G o tipo G que codificaban la siguiente secuencia: CTCGAGGGTATGAAAAAAACTAACAGATATCACGGCTAG (SEQ ID NO: 25). El virus recombinante se pseudotipó con la proteína G de Isfahan que tiene una identidad de secuencia proteica del 37 % en comparación con VSV G Ind. El RVR que comprendía el indicador FDL se denominó RVR_{Isf} (Isfahan) G^1 (en el que la versión 1 indica la presencia del gen indicador FL).

Además, los estudios de neutralización con anticuerpo demostraron que el suero que comprende anticuerpos de ratones inmunizados con VSV WT no neutralizaban significativamente la actividad del RVR Isf G1 *in vitro*.

Además, cuando se inyectaron los ratones los ratones inmunizados con VSV WT con el $RVR_{Isf}G^1$ el virus con el polipéptido Isf G es capaz de evadirse del sistema inmunitario. Como se muestra en la FIG. 6C, el $RVR_{Isf}G^1$ era detectable en distintas localizaciones de los ratones inmunizados después de la inoculación vírica. El nivel de $RVR_{Isf}G^1$ que se detecta en los ratones inmunizados era similar al nivel detectado en animales de control intactos (FIG. 6A). Por otra parte, no se detectaron virus en ratones inmunizados a los que se inoculó con VSV (FIG. 6B). Por lo tanto, los virus oncolíticos que comprenden el polipéptido G de Isf escapan de la respuesta inmunitaria del huésped al que se administró previamente VSV *in vivo*.

Estos resultados se confirmaron adicionalmente inyectando tumores en ratones intactos inmunizados con VSV o virus recombinante y se determinó que el virus se producía a partir de las inyecciones. Como se muestra en la FIG. 7, el virus recombinante inyectado en los tumores de ratones inmunizados o intactos producía grandes cantidades de virus de al progenie. Por otra parte, la propagación de VSV inyectado en ratones inmunizados era apenas detectable.

Se construyeron también dos RVR adicionales que comrendían el Isf. El $RVR_{Isf}G^2$ comprende un indicador genético RL en lugar del indicador genético FL del $RVR_{Isf}G^1$. También, el $RVR_{Isf}G^3$ comprende una proteína G VSV-Isf quimérica. La proteína quimérica (SEQ ID NO: 19) comprende el ectodominio G de Isfahan con el dominio de G transmembrana y la cola citoplasmática de VSV.

RVR con proteína G de Chandipura. La G de Chandipura tiene una homología de secuencia proteica del 42 % con la G de VSV (Indiana). Se utilizó la misma estrategia de clolnación descrita anteriormente para construir el $RVR_{Cha}G^1$. Una curva de crecimiento de una etapa con $RVR_{Cha}G^1$ demostraba que produce cantidades de virus similares en comparación con VSV (FIG. 8). Además, el RVR tenía una citotoxicidad similar en comparación con el VSV (FIG. 9).

RVR con proteína G de Maraba. La G de Maraba tiene una homología de secuencia proteica el 83 % con la G de VSV (Indiana). Este es el primer informe de la secuencia de la proteína G de Maraba proporcionada como una secuencia de ADN en la SEQ ID NO: 20. Se utilizó la misma estrategia de clonación descita anteriormente para construir $RVR_{Mar}G^1$. Una curva de crecimiento de una etapa con $RVR_{Mar}G^1$ demostraba que el título de virus recombinante era mayor que el de VSV a las 48 y 72 h. Por lo tanto, el cambio de proteína G puede estabilizar el virus y de esa manera aumentar el rendiminto (FIG. 10). Además, se demostró que el $RVR_{Mar}G^1$ era citotóxico (FIG. 11). Además, los ensayos de neutralización con anticuerpos demostraron que el suero de ratones inmunizados con VSV WT no neutralizaban la actividad de $RVR_{Mar}G^1$ indicando que el RVE es capaz de evasión inmunitaria.

RVR con Proteína G de Muir Springs. La G de Muir Springs tiene una homología de secuencia del 25,4 % con la G de VSV (Indiana). La secuencia de G de Muir Springs se proporciona en la SEQ ID NO: 21 (aminoácidos) y SEQ ID NO: 22 (ADN). Se utilizó la misma estrategia de clonación descrita anteriormente para construir el $RVR_{Mur}G^1$.

RVR con proteína G del virus Klamath. Los experimentos de pseudotipado confimraron que la proteína G de Klamath es funcional en un entorno con pH bajo (6,8), a diferencia de la G de VSV. Esto es de gran importancia ya que se sabe que el centro tumoral es hipóxico y ácido. Por lo tanto, puede ser una ventaja tener un virus que pueda replicarse en dicho entorno. El VSV HRGFP-Klamath pseudotipado se generó de manera que los viriones contenían el genoma de un virus pero las proteínas de envoltura de ambos virus por co-infección en células CT26. 24 horas depuse de la co infección se recolectó el sobrenadante y se titularon las partículas pseudotipadas. El virus pseudotipado se utilizó entonces (junto con un virus de control para infectar células diana en medios de dos diferentes acideces. Los resultados muestran que la proteína G de Klamath era responsable de la capacidad de infección del virus a pH bajo.

Esencialmente se utilizó la misma estrategia de clonación descrita anteriormente para construir el $RVR_{Kla}G^2$. Sin embargo, a diferencia de las estrategias previas, este recombinante incluye la G de Klamath además de la G de VSV (Indiana).

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

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

RVR con proteína Env del retrovirus JSR. Como el VSV tiene una neurotoxicidad conocida, una estrategia por la que un VSV recombinante no infectara las neuronas sería ventajosa. La Env JSR es originalmente del gen de envoltura (Env) no neurotrópico de un retrovirus JSRV (un virus no neurotrópico). Se generó una quimera que comprendía el ectodominio Env del JSRV con el dominio transmembrana y cola citoplasmática de G de VSV (secuencia de ADN proporcionada como SEQ ID NO: 23).

RVR con proteína G de Ébola. El Ébola es un virus no neurotrópico con una glicoporteían que funciona como receptor de unión y media en la fusión con la membrana. La proteína G contiene un sitio de escisión furin en la posición de aminoácidos 497-501. Los productos de la escisión (GP1 y GP2) se unen por enlaces disulfuro y se piensa que actúan como un posible señuelo para neutralizar anticuerpos o como inmunomodulador. Sin embargo el sitio de escisión furin no es necesario para la infección ni el tropismo. La secuencia del ADN de la proteína G del Ébola se proporciona como SEQ ID NO: 24.

Referencias

Patente de EE. UU. 4.554.101
Patente de EE. UU. 4.683.195
Patente de EE. UU. 4.683.202
Patente de EE. UU. 4.684.611
Patente de EE. UU. 4.800.159
Patente de EE. UU. 4.879.236
Patente de EE. UU. 4.883.750
Patente de EE. UU. 4.946.773
Patente de EE. UU. 4.952.500

Patente de EE. UU. 5.220.007
Patente de EE. UU. 5.279.721
Patente de EE. UU. 5.284.760
Patente de EE. UU. 5.302.523
Patente de EE. UU. 5.322.783
Patente de EE. UU. 5.354.670
Patente de EE. UU. 5.366.878
Patente de EE. UU. 5.384.253
Patente de EE. UU. 5.389.514
Patente de EE. UU. 5.399.363
Patente de EE. UU. 5.464.765
Patente de EE. UU. 5.466.468
Patente de EE. UU. 5.538.877
Patente de EE. UU. 5.538.880
Patente de EE. UU. 5.543.158
Patente de EE. UU. 5.550.318
Patente de EE. UU. 5.563.055
Patente de EE. UU. 5.580.859
Patente de EE. UU. 5.589.466
Patente de EE. UU. 5.591.616
Patente de EE. UU. 5.610.042
Patente de EE. UU. 5.635.377
Patente de EE. UU. 5.641.515
Patente de EE. UU. 5.656.610
Patente de EE. UU. 5.702.932
Patente de EE. UU. 5.736.524
Patente de EE. UU. 5.739.169
Patente de EE. UU. 5.780.448
Patente de EE. UU. 5.789.166
Patente de EE. UU. 5.789.215
Patente de EE. UU. 5.798.208
Patente de EE. UU. 5.801.005
Patente de EE. UU. 5.824.311
Patente de EE. UU. 5.830.650
Patente de EE. UU. 5.830.880
Patente de EE. UU. 5.840.873
Patente de EE. UU. 5.843.640
Patente de EE. UU. 5.843.650
Patente de EE. UU. 5.843.651
Patente de EE. UU. 5.843.663
Patente de EE. UU. 5.846.225
Patente de EE. UU. 5.846.233
Patente de EE. UU. 5.846.708
Patente de EE. UU. 5.846.709
Patente de EE. UU. 5.846.717
Patente de EE. UU. 5.846.726
Patente de EE. UU. 5.846.729
Patente de EE. UU. 5.846.783
Patente de EE. UU. 5.846.945
Patente de EE. UU. 5.849.481
Patente de EE. UU. 5.849.483
Patente de EE. UU. 5.849.486
Patente de EE. UU. 5.849.487
Patente de EE. UU. 5.849.497
Patente de EE. UU. 5.849.546
Patente de EE. UU. 5.849.547
Patente de EE. UU. 5.851.770
Patente de EE. UU. 5.851.772
Patente de EE. UU. 5.851.772
Patente de EE. UU. 5.853.990
Patente de EE. UU. 5.853.992
Patente de EE. UU. 5.853.993
Patente de EE. UU. 5.856.092
Patente de EE. UU. 5.858.652
Patente de EE. UU. 5.861.244
Patente de EE. UU. 5.863.732

Patente de EE. UU. 5.863.753
Patente de EE. UU. 5.866.331
Patente de EE. UU. 5.866.337
Patente de EE. UU. 5.866.366
Patente de EE. UU. 5.871.986
Patente de EE. UU. 5.882.864
Patente de EE. UU. 5.900.481
Patente de EE. UU. 5.905.024
Patente de EE. UU. 5.910.407
Patente de EE. UU. 5.912.124
Patente de EE. UU. 5.912.145
Patente de EE. UU. 5.912.148
Patente de EE. UU. 5.916.776
Patente de EE. UU. 5.916.779
Patente de EE. UU. 5.919.626
Patente de EE. UU. 5.919.630
Patente de EE. UU. 5.922.574
Patente de EE. UU. 5.925.517
Patente de EE. UU. 5.925.525
Patente de EE. UU. 5.925.565
Patente de EE. UU. 5.928.862
Patente de EE. UU. 5.928.869
Patente de EE. UU. 5.928.870
Patente de EE. UU. 5.928.905
Patente de EE. UU. 5.928.906
Patente de EE. UU. 5.929.227
Patente de EE. UU. 5.932.413
Patente de EE. UU. 5.932.451
Patente de EE. UU. 5.935.791
Patente de EE. UU. 5.935.819
Patente de EE. UU. 5.935.825
Patente de EE. UU. 5.939.291
Patente de EE. UU. 5.942.391
Patente de EE. UU. 5.945.100
Patente de EE. UU. 5.981.274
Patente de EE. UU. 5.994.624
Abschuetz y col., Cell Tissue Res., 325(3):423-36, 2006.
Almendro y col., J. Immunol., 157(12):5411-5421, 1996.
Angel y col., Cell, 49:729, 1987a.
Angel y col., Mol. Cell. Biol., 7:2256, 1987b.
Austin-Ward y Villaseca, Revista Médica de Chile, 126(7):838-845, 1998.
Ausubel y col., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994.
Bajorin y col., J. Clin. Oncol., 6(5):786-792, 1988.
Bakhshi y col., Cell, 41(3):899-906, 1985.
Banerji y col., Cell, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
Banerji y col., Cell, 33(3):729-740, 1983.
Bergmann y col., Cancer Res., 61(22):8188-93, 2001.
Berkhout y col., Cell, 59:273-282, 1989.
Blanar y col., EMBO J., 8:1139, 1989.
Blood. 2001 jun 15;97(12):3746-54
Bodine y Ley, EMBO J., 6:2997, 1987.
Boshart y col., Cell, 41:521, 1985.
Bosze y col., EMBO J., 5(7):1615-1623, 1986.
Braddock y col., Cell, 58:269, 1989.
Braisted y Wells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(12):5688-5692, 1996.
Bukowski y col., Clinical Cancer Res., 4(10):2337-2347, 1998.
Bulla y Siddiqui, J. Virology, 62:1437, 1986.
Burton y Barbas, Adv. Immunol., 57:191-280, 1994.
Campbell y Villarreal, Mol. Cell. Biol., 8:1993, 1988.
Campere y Tilghman, Genes and Dev., 3:537, 1989.
Campo y col., Nature, 303:77, 1983.
Carbonelli y col., FEMS Microbiol. Lett., 177(1):75-82, 1999.
Celander y Haseltine, J. Virology, 61:269, 1987.
Celander y col., J. Virology, 62:1314, 1988.
Chandler y col., Cell, 33:489, 1983.
Chandler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8):3596-601, 1997.

Chang y col., Mol. Cell. Biol., 9:2153, 1989.
Chatterjee y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9114, 1989.
Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.
Choi y col., Cell, 53:519, 1988.
Christodoulides y col., Microbiology, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
Cleary y Sklar, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(21):7439-7443, 1985.
Cleary y col., J. Exp. Med., 164(1):315-320, 1986.
Cocea, Biotechniques, 23(5):814-816, 1997.
Coffey y col., Science, 282(5392):1332-4, 1998.
Cohen y Wittenauer, J. Cardiovasc. Pharmacol., 10:176-181, 1987.
Costa y col., Mol. Cell. Biol., 8:81-90, 1988.
Cripe y col., EMBO J., 6:3745, 1987.
Culotta y Hamer, Mol. Cell. Biol., 9:1376-1380, 1989.
Culver y col., Science, 256(5063):1550-1552, 1992.
Cunningham y col., Science, 244(4908):1081-1085, 1989.
Dandolo y col., J. Virology, 47:55-64, 1983.
Davidson y col., J. Immunother., 21(5):389-398, 1998.
de Villiers y col., Nature, 312(5991):242-246, 1984.
Deschamps y col., Science, 230:1174-1177, 1985.
Dillman, Cancer Biother. Radiopharm., 14(1):5-10, 1999.
Edbrooke y col., Mol. Cell. Biol., 9:1908-1916, 1989.
Edlund y col., Science, 230:912-916, 1985.
Solicit. Europea 320 308
Solicit. Europea 329 822
Fechheimer, y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
Feng y Holland, Nature, 334:6178, 1988.
Firak y Subramanian, Mol. Cell. Biol., 6:3667, 1986.
Foecking y Hofstetter, Gene, 45(1):101-105, 1986.
Fraley y col., Bio/Technology, 3:629-635, 1985.
Frohman, In: PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N.Y., 1990.
Fuerst y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 3:8122-8126, 1986.
Fuerst y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3: 8122-26, 1986.
Fujita y col., Cell, 49:357, 1987.
GB Appln. 2 202 328
Gilles y col., Cell, 33:717, 1983.
Gloss y col., EMBO J., 6:3735, 1987.
Godbout y col., Mol. Cell. Biol., 8:1169, 1988.
Goodbourn y Maniatis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1447, 1988.
Goodbourn y col., Cell, 45:601, 1986.
Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985.
Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
Greene y col., Immunology Today, 10:272, 1989.
Gromeier y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(12):6803-8, 2000.
Grosschedl y Baltimore, Cell, 41:885, 1985.
Grote y col., Blood., 97(12):3746-54, 2001.
Hanibuchi y col., Int. J. Cancer, 78(4):480-485, 1998.
Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101(3): 1094-1099, 1985.
Haslinger y Karin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8572, 1985.
Hauber y Cullen, J. Virology, 62:673, 1988.
Heise y col., Nat. Med., 6(10):1134-9, 2000.
Hellstrand y col., Acta Oncologica, 37(4):347-353, 1998.
Hen y col., Nature, 321:249, 1986.
Hensel y col., Lymphokine Res., 8:347, 1989.
Herr y Clarke, Cell, 45:461, 1986.
Hilton y col., J. Biol. Chem., 271(9):4699-4708, 1996.
Hirochika y col., J. Virol., 61:2599, 1987.
Hirsch y col., Mol. Cell. Biol., 10:1959, 1990.
Holbrook y col., Virology, 157:211, 1987.
Holden y col., EMBO J., 6:1565-1570, 1987.
Horlick y Benfield, Mol. Cell. Biol., 9:2396, 1989.
Huang y col., Cell, 27:245, 1981.
Hug y col., Mol. Cell. Biol., 8:3065-3079, 1988.
Hui y Hashimoto, Infection Immun., 66(11):5329-5336, 1998.
Hwang y col., Mol. Cell. Biol., 10:585, 1990. Imagawa y col., Cell, 51:251, 1987.
Imbra y Karin, Nature, 323:555, 1986. Imler y col., Mol. Cell. Biol., 7:2558, 1987.
Imperiale y Nevins, Mol. Cell. Biol., 4:875, 1984.

Innis y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(24):9436-9440, 1988.
Irie y Morton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(22):8694-8698, 1986.
Irie y col., Lancet., 1(8641):786-787, 1989.
Jakobovits y col., Mol. Cell. Biol., 8:2555, 1988.
Jameel y Siddiqui, Mol. Cell. Biol., 6:710, 1986.
Jaynes y col., Mol. Cell. Biol., 8:62, 1988.
Johnson y col., Amer. J. Physiol., 256:H1012-1022, 1989.
Ju y col., Gene Ther., 7(19):1672-1679, 2000.
Kadesch y Berg, Mol. Cell. Biol., 6:2593, 1986.
Kaeppler y col., Plant Cell Reports, 9:415-418, 1990.
Kaneda y col., Science, 243:375-378, 1989.
Karin y col., Mol. Cell. Biol., 7:606, 1987.
Katinka y col., Cell, 20:393, 1980.
Katinka y col., Nature, 290:720, 1981.
Kato y col, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
Kawamoto y col., Mol. Cell. Biol., 8:267, 1988.
Kerschner y col., J. Gen. Virol., 67 (Pt 6):1081-9, 1986.
Kiledjian y col., Mol. Cell. Biol., 8:145, 1988.
Kinoh y col., Gene Ther., 11(14): 1137-45, 2004.
Klamut y col., Mol. Cell. Biol., 10:193, 1990.
Koch y col., Mol. Cell. Biol., 9:303, 1989.
Kraus y col. FEBS Lett., 428(3):165-170, 1998.
Kriegler y Botchan, In: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
Kriegler y Botchan, Mol. Cell. Biol., 3:325, 1983. Kriegler y col., Cell, 38:483, 1984. Kriegler y col., Cell, 53:45, 1988.
Kriegler y col., In: Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes, Van de Woude y col. eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.
Kriegler y col., In: Gene Expression, Alan Liss (Ed.), Hamer y Rosenberg, New York, 1983. Kuhl y col., Cell, 50:1057, 1987.
Kunz y col., Nucl. Acids Res., 17:1121, 1989.
Kwoh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173, 1989.
Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.
Lareyre y col., J. Biol. Chem., 274(12):8282-8290, 1999.
Larsen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83:8283, 1986.
Laspia y col., Cell, 59:283, 1989. Latimer y col., Mol. Cell. Biol., 10:760, 1990.
Lee y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 238(2):462-467, 1997.
Lee y col., Nature, 294:228, 1981. Lee y col., Nucleic Acids Res., 12:4191-206, 1984.
Levenson y col., Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
Levinson y col., Nature, 295:79, 1982.
Lin y col., Cytogenet. Cell Genet., 53:169-171, 1990.
Logg y col., Hum. Gene Ther., 12(8):921-32, 2001.
Luria y col., EMBO J., 6:3307, 1987.
Lusky y Botchan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3609, 1986.
Lusky y col., Mol. Cell. Biol., 3:1108, 1983.
Macejak y Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
Majors y Varmus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80:5866, 1983.
McNeall y col., Gene, 76:81, 1989.
Miksicek y col., Cell, 46:203, 1986.
Mineta y col., Nat. Med., 1(9):938-43, 1995.
Mitchell y col., Ann. NY Acad. Sci., 690:153-166, 1993.
Mitchell y col., J. Clin. Oncol., 8(5):856-869, 1990.
Mordacq y Linzer, Genes and Dev., 3:760, 1989.
Moreau y col., Nucl. Acids Res., 9:6047, 1981.
Morton y col., Arch. Surg., 127:392-399, 1992.
Muesing y col., Cell, 48:691, 1987.
Muir Springs y Bahia Grande: J Gen Virol. 1986 jun ;67 (Pt 6):1081-9 Ng y col., Nuc. Acids Res., 17:601, 1989.
Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
Nicolau y col., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
Nomoto y col., Gene, 236(2):259-271, 1999.
Ohara y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5673-5677, 1989.
Omirulleh y col., Plant Mol. Biol., 21(3):415-428, 1993.
Omitz y col., Mol. Cell. Biol. 7:3466, 1987.
Oncol Res. 1999; 11(3):133-44.
Ondek y col., EMBO J., 6:1017, 1987.
Palmiter y col., Cell, 29:701, 1982.

Palmiter y col., Nature, 300:611, 1982.
Solicit. PCT PCT/US87/00880
Solicit. PCT PCT/US89/01025
Solicit. PCT WO 88/10315
Solicit. PCT WO 89/06700
Solicit. PCT WO 90/07641
Solicit. PCT WO 94/09699
Solicit. PCT WO 95/06128
Pech y col., Mol. Cell. Biol., 9:396, 1989.
Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.
Perez-Stable y Constantini, Mol. Cell. Biol., 10:1116, 1990.
Picard y Schaffner, Nature, 307:83, 1984.
Pietras y col., Oncogene, 17(17):2235-2249, 1998.
Pinkert y col., Genes and Dev., 1:268, 1987.
Ponta y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:1020, 1985.
Porton y col., Mol. Cell. Biol., 10:1076, 1990.
Potrykus y col., Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.
Qin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.
Queen y Baltimore, Cell, 35:741, 1983.
Quinn y col., Mol. Cell. Biol., 9:4713, 1989.
Ravindranath y Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303-329, 1991.
Redondo y col., Science, 247:1225, 1990.
Reisman y Rotter, Mol. Cell. Biol., 9:3571, 1989.
Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580, 1990.
Resendez Jr. y col., Mol. Cell. Biol., 8:4579, 1988.
Rippe y col., Mol. Cell. Biol., 9(5):2224-22277, 1989.
Rittling y col., Nuc. Acids Res., 17:1619, 1989.
Rodríguez y col. (1990) J. Virol., 64:4851-4857, 1990.
Rodríguez y col., J Virol., 64:4851-4857, 1990.
Rosen y col., Cell, 41:813, 1988.
Rosenberg y col., Ann. Surg., 210(4):474-548, 1989.
Rosenberg y col., N. Engl. J. Med., 319:1676, 1988.
Sakai y col., Genes and Dev., 2:1144, 1988.
Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
Satake y col., J. Virology, 62:970, 1988.
Schaffner y col., J. Mol. Biol., 201:81, 1988.
Searle y col., Mol. Cell. Biol., 5:1480, 1985.
Shafren y col., Clin. Cancer Res., 10(1 Pt 1):53-60, 2004.
Sharp y Marciniak, Cell, 59:229, 1989.
Shaul y Ben-Levy, EMBO J., 6:1913, 1987.
Sherman y col., Mol. Cell. Biol., 9:50, 1989.
Sinkovics y Horvath. J. Clin. Virol., 16(1):1-15, 2000.
Sleigh y Lockett, J. EMBO, 4:3831, 1985.
Spalholz y col., Cell, 42:183, 1985.
Spandau y Lee, J. Virology, 62:427, 1988.
Spandidos y Wilkie, EMBO J., 2:1193, 1983.
Stephens y Hentschel, Biochem. J., 248:1, 1987.
Stillman y col., J. Virol., 69: 2946-53, 1995.
Stillman y col., J. Virol., 69:2946-2953, 1995.
Stojdl y col., Cancer Cell., 4(4):263-75, 2003.
Stojdl y col., Nat Med., 6(7):821-5, 2000.
Stuart y col., Nature, 317:828, 1985.
Sullivan y Peterlin, Mol. Cell. Biol., 7:3315, 1987.
Swartzendruber y Lehman, J. Cell. Physiology, 85:179, 1975.
Takada y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1997.
Takada y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997.
Takebe y col., Mol. Cell. Biol., 8:466, 1988.
Tavernier y col., Nature, 301:634, 1983.
Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10:165, 1990a.
Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10:176, 1990b.
Taylor y col., J. Biol. Chem., 264:15160, 1989.
Thiesen y col., J. Virology, 62:614, 1988.
Timiryasova y col., Oncol. Res., 11(3):133-44, 1999.
Treisman, Cell, 46(4):567-174, 1986
Tronche y col., Mol. Biol. Med., 7:173, 1990.
Tronche y col., Mol. Cell Biol., 9(11):4759-4766, 1989.

Trudel y Constantini, Genes and Dev., 6:954, 1987.
Tsujimoto y Croce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(14):5214-5218, 1986.
Tsujimoto y col., Nature, 315:340-343, 1985.
Tsumaki y col., J. Biol. Chem., 273(36):22861-22864, 1998.
Unno y col., Clin. Cancer Res., 11(12):4553-60, 2005.
Usdin y col., (1993) BioTechniques, 14:222-224, 1993.
Usdin y col., Bio. Techniques., 14:222-224, 1993.
Vannice y Levinson, J. Virology, 62:1305, 1988.
Vasseur y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77:1068, 1980.
Walker y col., Nucleic Acids Res. 20(7):1691-1696, 1992.
Wang y Calame, Cell, 47:241, 1986.
Warren y col., Biochemistry, 35(27):8855-8862, 1996.
Weber y col., Cell, 36:983, 1984.
Weinberger y col., Mol. Cell. Biol., 8:988, 1984.
Wells y col., J. Leukoc. Biol., 59(1):53-60, 1996.
Winoto y Baltimore, Cell, 59:649, 1989.
Wong y col., Gene, 10:87-94, 1980.
Wu y col., J. Exp. Med., 185:1681-1691, 1997.
Yelton y col., J. Immunol., 155(4):1994-2004, 1995.
Yutzey y col., Mol. Cell. Biol., 9:1397-1405, 1989.
Zeng y col., Biochemistry, 35(40):13157-13164, 1996.
Zhao-Emonet y col., Biochim. Biophys. Acta, 1442(2-3):109-119, 1998.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> STOJDL, DAVID

<120> RHABDOVIRUS ONCOLÍTICOS

<130> FUL-338 EP DIV 1

<140> Aun desconocido
<141> 17-09-2007

<150> 60/844.726
<151> 15-09-2006

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 11068
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 1

```
ctgttacagt caagagagtc attgatgatt cactcatcac ccccaaattg cctgcgaatg     60
aggaccctgt ggagtaccct gctgattatt tcaaaaagtc ccgtgatatt ccggtgtaca    120
taaacacgac caaaagtttg tctgatttgc ggggctatgt ttatcaaggc ctaaagtcag    180
gcaacatctc tataattcat gtcaacagtt atctgtatgc agcattaaaa gagatcagag    240
gaaaattgga cagagattgg atcacctttg gtatccaaat cggaaaaaca ggagatagcg    300
tggggatatt cgatttactg accctaaaac ctctagatgg tgttttacca gatggggtgt    360
ctgatgctac tcgaactagc tcagacgatg catggcttcc actgtatcta ttggggttat    420
acagagttgg tcgaacacag atgccagaat acaggaagaa gctgatggat ggtctgatta    480
atcaatgtaa gatgatcaat gagcagtttg aaccactgtt gccagaagga agagatgtct    540
ttgatgtctg gggaaatgac agcaattaca caaagattgt ggccgctgta gatatgttct    600
tccatatgtt caaaaagcat gagaaggcct ctttcaggta tggcacaata gtgtcaagat    660
ttaaggattg tgcagcattg gctacatttg gtcatctgtg taagatcact ggtatgtcca    720
ctgaagatgt gacaacttgg attctaaaca gggaggtggc tgatgagatg gttcaaatga    780
tgtacccagg acaggagata gataaggctg attcttacat gccttatcta atcgacttag    840
gtctgtcctc aaaatctcca tatccatcag ttaaaaatcc agctttccat ttttggggtc    900
aattgaccgc attgttactg agatcaacca gagccagaaa tgcacgtcag ccggatgaca    960
tcgagtatac atccctgacc actgctgggc tgttgtatgc atatgccgtt ggttcgtctg   1020
cagacctggc tcaacaattc tacgttgggg acaacaagta tgtgccagaa actggagatg   1080
```

gaggattaac caccaatgca ccgccacaag ggcgagatgt ggtcgagtgg cttagttggt 1140

ttgaagatca aaacagaaaa cctaccccag acatgctcat gtatgctaag agagctgtca 1200

gtgctttaca aggattgagg gagaagacga ttggcaagta cgccaagtca gagtttgaca 1260

aatgacaact cactcaccat atgtattact acctttgctt catatgaaaa aaactaacag 1320

cgatcatgga tcagctatca aaggtcaagg aattccttaa gacttacgcg cagttggatc 1380

aagcagtaca agagatggat gacattgagt ctcagagaga ggaaaagact aattttgatt 1440

tgtttcagga agaaggattg gagattaagg agaagccttc ctattatcgg gcagatgaag 1500

aagagattga ttcagatgaa gacagcgtgg atgatgcaca agacttaggg atacgtacat 1560

caacaagtcc catcgagggg tatgtggatg aggagcagga tgattatgag gatgaggaag 1620

tgaacgtggt gtttacatcg gactggaaac agcctgagct ggaatccgac ggggatggga 1680

aaactctccg attgacgata ccagatggat tgactgggga gcagaagtcg caatggcttg 1740

ccacgattaa ggcagttgtt cagagtgcta aatattggaa catctcagaa tgttcatttg 1800

agagttatga gcaaggggtt ttgattagag agagacaaat gactcctgat gtctacaaag 1860

tcactcctgt tttaaatgct ccaccggttc aaatgacagc taatcaagat gtttggtctc 1920

tcagcagcac tccatttaca tttttgccca agaaacaagg tgtgactcca ttgaccatgt 1980

ccttagaaga actcttcaac acccgaggtg aattcatatc tctgggagga aacgggaaaa 2040

tgagtcaccg ggaggccatc attctagggt tgagacacaa gaagctctat aatcaagcca 2100

gactaaagta taacttagct tgaatatgaa aaaaactaac agatatcaaa agatatctct 2160

aactcagtcc attgtgttca gttcaatcat gagctctctc aagaaaattt tgggtattaa 2220

agggaaaggg aagaaatcta agaaattagg tatggctccc ccaccctatg aagaagagac 2280

tccaatggaa tattctccaa gtgcacctta tgataagtca ttgtttggag tcgaagatat 2340

ggatttccat gatcaacgtc aactccgata tgagaaattt cacttctcat tgaagatgac 2400

tgtgagatca aacaaaccat ttcgaaatta tgatgacgtt gcagcagcgg tgtccaattg 2460

ggatcatatg tacatcggca tggcaggaaa acgtcctttt tataagatat tagcattcat 2520

gggttctact ctattgaagg ctacaccagc tgtcttggct gaccaaggac agccagaata 2580

tcatgctcac tgtgagggac gagcttactt gccgcatcgg ttagggccga cccctccgat 2640

gttgaatgtc cctgaacatt ttcgccgtcc atttaacatc ggattattca gagggacaat 2700

cgacataacc ctggtacttt tcgatgatga atctgtagat tctgccccgg tcatatggga 2760

tcattttaat gcatccagat tgagcagctt cagagaaaag gctttgttgt ttggtttgat 2820

tctagaaaag aaagccactg ggaattgggt attggactct attagtcatt tcaagtaatt 2880

atcacaagtg ttgaggtgat gggcagacta tgaaaaaaac taacagggtt caaacactct 2940

tgatcgaggt acccagttat atttgttaca acaatgttga gacttttttct cttttgtttc 3000

ttggccttag gagcccactc caaatttact atagtattcc ctcatcatca aaaagggaat 3060

tggaagaatg tgccttccac atatcattat tgcccttcta gttctgacca gaattggcat 3120

aatgatttga ctggagttag tcttcatgtg aaaattccca aaagtcacaa agctatacaa 3180

gcagatggct ggatgtgcca cgctgctaaa tgggtgacta cttgtgactt cagatggtac 3240

ggacccaaat acatcacgca ttccatacac tctatgtcac ccaccctaga acagtgcaag 3300

accagtattg agcagacaaa gcaaggagtt tggattaatc caggctttcc ccctcaaagc 3360

tgcggatatg ctacagtgac ggatgcagag gtggttgttg tacaagcaac acctcatcat 3420

gtgttggttg atgagtacac aggagaatgg attgactcac aattggtggg gggcaaatgt 3480

tccaaggagg tttgtcaaac ggttcacaac tcgaccgtgt ggcatgctga ttacaagatt 3540

acagggctgt gcgagtcaaa tctggcatca gtggatatca ccttcttctc tgaggatggt 3600

caaaagacgt ctttgggaaa accgaacact ggattcagga gtaattactt tgcttacgaa 3660

agtggagaga aggcatgccg tatgcagtac tgcacacaat gggggatccg actaccttct 3720

ggagtatggt ttgaattagt ggacaaagat ctcttccagg cggcaaaatt gcctgaatgt 3780

cctagaggat ccagtatctc agctccttct cagacttctg tggatgttag tttgatacaa 3840

gacgtagaga ggatcttaga ttactctcta tgccaggaga cgtggagtaa gatacgagcc 3900

aagcttcctg tatctccagt agatctgagt tatctcgccc caaaaaatcc agggagcgga 3960

ccggccttca ctatcattaa tggcactttg aaatatttcg aaacaagata catcagagtt 4020

gacataagta atcccatcat ccctcacatg gtgggaacaa tgagtggaac cacgactgag 4080

cgtgaattgt ggaatgattg gtatccatat gaagacgtag agattggtcc aaatggggtg 4140

ttgaaaactc ccactggttt caagtttccg ctgtacatga ttgggcacgg aatgttggat 4200

tccgatctcc acaaatcctc ccaggctcaa gtcttcgaac atccacacgc aaaggacgct 4260

gcatcacagc ttcctgatga tgagacttta ttttttggtg acacaggact atcaaaaaac 4320

ccagtagagt tagtagaagg ctggttcagt agctggaaga gcacattggc atcgttcttt 4380

ctgattatag gcttgggggt tgcattaatc ttcatcattc gaattattgt tgcgattcgc 4440

tataaataca aggggaggaa gacccaaaaa atttacaatg atgtcgagat gagtcgattg 4500

ggaaataaat aacagatgac gcatgagggt cagatcagat ttacagcgta agtgtgatat 4560

ttaggattat aaaggttcct tcattttaat ttgttacaga ctgtatgaaa aaaactcatc 4620

aacagccatc atggatgtta acgattttga gttgcatgag gactttgcat tgtctgaaga 4680

tgactttgtc acttcagaat ttctcaatcc ggaagaccaa atgacatacc tgaatcatgc 4740

cgattataat ttgaattctc ccttaatcag cgatgatatt gatttcctga tcaagaaata 4800

taatcatgag caaattccga aaatgtggga tgtaaagaat tgggagggag tgttagagat 4860

gttgacagcc tggcaagcca gtccaatttt atctagcact atgcataagt gggtgggaaa 4920

gtggctcatg tctgatgatc atgacgcaag ccaaggcttc agttttcttc atgaagtgga 4980

caaagaagct gatctgacgt ttgaggtggt ggagacattc attagaggat ggggaggtcg 5040

agaattgcag tacaagagga aagacacatt tccggactcc tttagagttg cagcctcatt 5100

gtgtcaaaaa ttccttgatt tgcacaaact cactctgata atgaattcag tctctgaagt 5160

cgaacttacc aacctagcaa agaattttaa aggaaaaaac aggaaagcaa aaagcggaaa 5220

tctgataacc agattgaggg ttcccagttt aggtcctgct tttgtgactc agggatgggt 5280

gtacatgaag aagttggaaa tgattatgga tcggaatttt ttgttgatgt tgaaagacgt 5340

tatcatcggg aggatgcaga cgatcctgtc catgatctca agagatgata atctcttctc 5400

cgagtctgat atctttactg tattaaagat ataccggata ggggataaga tattagaaag 5460

gcaagggaca aagggttacg acttgatcaa aatgattgag cctatttgta acttaaagat 5520

gatgaatctg gcacgtaaat atcgtcctct catccctaca tttcctcatt ttgaaaaaca 5580

tattgctgac tctgttaagg aaggatcgaa aatagacaaa gggattgagt ttatatatga 5640

tcacattatg tcaatccctg gtgtggactt gaccttagtt atttacggat catttcggca 5700

ctggggtcat ccttttatca actactatga gggcttagag aagctacaca agcaggttac 5760

aatgcccaag actattgaca gagaatatgc agaatgtctt gctagtgatc tggcaagaat 5820

cgttcttcag caacaattca atgaacataa gaaatggttt gttgatgtag ataaagtccc 5880

acaatcccat cctttcaaaa gccatatgaa agagaatact tggcctactg cagcccaagt 5940

tcaggattac ggcgatcgct ggcatcagct cccactcatc aaatgcttcg aaatcccaga 6000

tttgttagat ccatcgatca tctactcaga caaaagtcat tccatgaacc ggtctgaagt 6060

actacgacat gtaagactta cacctcatgt gcccattcca agcaggaaag tattgcagac 6120

aatgttggag actaaggcaa cagactggaa agagttttta aagaaaattg acgaagaggg 6180

gttagaggat gatgatcttg tcataggact caaagggaaa gagagagaat taaaaattgc 6240

gggaagattc ttttctttga tgtcctggaa gctcagagag tattttgtca tcactgagta 6300

tttgattaag acgcactttg tcccgatgtt taaagggttg accatggcgg atgacttgac 6360

agcggtgata aagaagatga tggacacatc ttcaggacaa ggcttagata attatgaatc 6420

catttgtata gccaaccata ttgactatga gaagtggaac aatcatcaaa gaaaagagtc 6480

gaacgggccc gtgttcaagg tgatgggtca attcttggga tatccacgtc tgattgagag 6540

aactcatgaa ttttttgaga agagtctgat atattacaat ggacgaccag atctgatgcg 6600

ggttcgagga aattctctag tcaacgcctc atctttaaat gtctgctggg agggtcaagc 6660

tgggggatta gaaggactgc gacagaaggg atggagtatt ctaaatttgc ttgtcattca 6720

gagagaagca aaaataagga acaccgccgt gaaagtgcta gctcaaggtg acaatcaggt 6780

gatatgtact cagtataaaa cgaagaaatc ccggaatgat attgagctta aggcagctct 6840

aacacagatg gtatctaata atgagatgat tatgtctgcg attaaatcag gcaccgagaa 6900

actgggtctt ttgattaatg atgatgagac aatgcaatct gctgattacc tcaattacgg 6960

gaaggttccc attttcagag gagtaatcag aggccttgag acaaaaagat ggtcacgcgt 7020

gacctgtgtg acaaatgatc agattccaac gtgtgcgaac attatgagct ctgtgtcaac 7080

taatgcatta actgtagccc attttgccga gaatccagtc aatgccatca ttcagtataa 7140

ctactttgga acatttgcaa ggctactgct gatgatgcat gaccccgctc tgaggatctc 7200

tctgtatgaa gtccaatcaa aaattccagg acttcacagt ttgacattta aatattctat 7260

gttgtatctg gatccttcga taggaggagt ctccggaatg tcactctcga gattcctcat 7320

aagatcattt ccagatccag tgacagaaag tttggcgttc tggaaattta tccactctca 7380

tgcaagaagc gattcattaa aggagatatg tgcagttttt ggaaatcctg aaattgcaag 7440

atttcggcta actcatgtcg ataaattggt ggaagaccca acctcattga acatagctat 7500

gggaatgagt cctgctaatc tattaaagac agaggtaaaa aaatgtctac tggaatcaag 7560

gcagagcatc aagaaccaga ttgtaagaga tgctactatt tacctacacc atgaggaaga 7620

caaacttcgt agtttcttat ggtccataac accactgttc cctcggttct tgagtgaatt 7680

caaatctggg acattcatcg gagtagcaga tggcctgatc agcttatttc agaactctag 7740

gactattcga aattctttta aaaagcgtta tcacagggaa cttgatgatt taataatcaa 7800

gagcgaagtt tcctcactta tgcatttggg taagctacat ttgaggcgag gctcagttcg 7860

tatgtggact tgctcttcta ctcaggctga tcttctccga ttccggtcat ggggaagatc 7920

tgttatagga accacagtcc ctcatccctt agagatgtta ggacaacatt ttaaaaagga 7980

gactccttgc agtgcttgca acatatccgg attagactat gtatctgtcc actgtccgaa 8040

tgggattcat gacgtttttg aatcacgtgg tccactccct gcatatttgg gttctaaaac 8100

atccgaatca acttcgatct tgcagccgtg ggagagagag agtaaagtac cgttgattaa 8160

gcgtgccaca aggcttcgtg atgcaatttc atggtttgtg tctcccgact ctaacttggc 8220

ctcaactatc cttaagaaca taaatgcatt aacaggagaa gaatggtcaa agaagcagca 8280

tggatttaaa aggacgggat cggcgttaca caggttctcc acatccagga tgagtcatgg 8340

tggttttgct tctcagagta cggctgcctt gactagattg atggcaacta ctgacactat 8400

gagagatctg ggagaacaga actatgattt cctgtttcag gcgacattat tgtatgctca 8460

aataaccaca actgtagtca ggaatggatc atttcatagc tgcacggacc attaccatat 8520

aacctgcaaa tcttgtctga gggccattga tgagattacc ttggattcag cgatggaata 8580

tagccctcca gatgtatcat cagttttaca atcttggagg aatggagaag gctcttgggg 8640

acatgaagtg aaacaaatat acccagttga aggtgactgg aggggactat ctcctgttga 8700

acaatcttat caagtcggac gctgtatcgg gtttctgttc ggtgatctgg cgtatagaaa 8760

atcatcccat gcagatgata gctccatgtt tccgttatct atacaaaaca aagtcagagg 8820

aagaggcttt ttaaaagggc ttatggatgg gttaatgaga gccagttgtt gccaggtgat 8880

ccatcgtcga agcttagccc atctgaagag accggctaat gcagtctatg gagggctgat 8940

ttatttgata gacaaattga gtgcatctgc ccctttttctt tcactgacga gacatggacc 9000

tttaagggaa gaattagaaa ctgttccaca taagataccg acttcttatc ctacgagcaa 9060

ccgagatatg ggggtgatag ttcgtaatta ttttaaatat cagtgcagac tggtagaaaa 9120

aggtcggtac aagacacatt atcctcaatt gtggcttttc tcagatgtgc tgtccattga 9180

tttcttagga cccctgtcta tatcttcaac tctattgggt attctgtata aacagacgtt 9240

atcttctcga gacaaaaatg agttgagaga actcgctaac ttgtcttcat tgttgagatc 9300

aggagaagga tgggaagata tccatgtcaa attcttctct aaggacactt tactctgccc 9360

tgaagagatc cgacatgcgt gcaaatttgg gattgctaag gaatccgctg ttttaagcta 9420

ttatcctcct tggtctcaag agtcttatgg aggcatcacc tcgatccccg tatatttttc 9480

gaccaggaag tatcccaaaa ttttagatgt ccctcctcgg gttcaaaacc cattggtctc 9540

gggtctacga ttggggcaac tccctactgg agcacattat aagattagga gcattgtaaa 9600

gaacaagaac cttcgttata gagatttcct tagttgtggg gatggatctg gggggatgac 9660

cgcggcacta ttgagagaaa acagacaaag taggggaatc ttcaacagcc tgttagagtt 9720

agccggatct cttatgagag gagcatctcc agagcctcca agtgcactgg agacgctcgg 9780

gcaagaacga tctaggtgtg tgaatggaag cacatgttgg gagtactcat ctgacctaag 9840

ccaaaaagag acatgggatt acttcttaag attgaagaga ggcctgggtt tgaccgtgga 9900

cttaatcacc atggacatgg aggtcagaga ccctaataca agtttgatga tagaaaagaa 9960

cctcaaagtt tatctgcatc agatattaga accaactggt gtcttaatat ataaaacata 10020

cgggacccat attgcgacac aaacagataa tatcctgacg ataatcggtc ctttctttga 10080

gacggttgac ctagtccagt ccgaatacag cagctcacaa acgtccgagg tctattttgt 10140

aggacgaggc ttgcgctctc atgttgacga accctgggtg gactggccat ccttaatgga 10200

caattggaga tccatttatg cttttcatga tcctactaca gaatttatca gagcaaaaaa 10260

agtctgtgaa attgacagtc ttataggcat tccggctcaa ttcattccag acccatttgt 10320

aaatctcgag accatgctac agatagttgg tgttccaaca ggagtttcgc atgccgcagc 10380

tctattatca tcacaatatc caaatcaatt ggtcacaacg tcaatatttt atatgacact 10440

cgtgtcttat tataatgtaa accatattcg aagaagcccc aagcctttct ctcctccgtc 10500

tgatggagtc tcacagaaca ttggttcagc catagtcgga ctaagttttt gggtgagttt 10560

gatggagaat gatctcggat tatacaaaca ggctctaggt gcaataaaga cgtcattccc 10620

tattagatgg tcctctgtcc agaccaagga tgggtttaca caagaatgga gaactaaagg 10680

aaacggaatt cctaaagatt gtcgtctctc agactctttg gctcagatag gaaactggat 10740

cagagcgatg gaattggtta ggaacaaaac gaggcaatca ggattttctg aaaccctatt 10800

tgatcaattc tgcggacttg cagaccatca cctcaaatgg cggaagttgg gaaacagaac 10860

aggaattatt gattggctaa ataatagaat ttcatccatt gacaaatcca tcttggtgac 10920

caaaagtgat ctgcatgacg agaactcatg gagggagtga agatgtattc ttccacctct 10980

cattgggtga tacccatata tgaaaaaaac tataagtact ttaaactctc tttgtttttt 11040

aatgtatatc tggttttgtt gtttccgt 11068

<210> 2
<211> 422
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Asp Ala Trp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val
```

130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Glu Phe Asp Lys
            420
```

<210> 3
<211> 265
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Glu Gln Gly Val Leu Ile Arg Glu Arg Gln Met Thr Pro Asp Val
```

```
                    165                 170                 175

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

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

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

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

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

Gln Ala Arg Leu Lys Tyr Asn Leu Ala
            260                 265
```

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

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser His Phe Lys
225
```

<210> 5
<211> 512
<212> PRT

<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Ile Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met
```

530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Pro  Gln Leu Trp Leu Phe  Ser Asp Val Leu Ser  Ile Asp Phe
```

```
    1505                1510                1515

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Ser Trp Arg Glu
2105

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

<220>
<223> *Virus Carajas*

<400> 7
cggccggtcg acgctgccta tttacttact gggtctttac cgtgttggaa kaacaaaact 60

gccggaatac cgaaagaagt tgatggaggg gttggaaatg cagtgtaaaa tcatgtatcc 120

tgactttgta ccaatcgttc cggaaggaat ggacttcttt gatgtgtggg gaaatgatag 180

taatttcacc aaaatagtcg ccgcagtgga tatgtttttc catatgttca aaaagcatga 240

gagagcatcc ctcagatatg gaacaattgt ctccagattc aaggattgtg ctgcattggc 300

tacatttggc catgtatgta aagtttccgg aatgtccaca gaggaggtca ccacttgggt 360

gctgaatagg gaagtggcag acgaattatg ccagatgatg ttccctggac aggaaataga 420

ccgagcggac tcatacatgc cgtatatgat agatttcggg ttgtctcaga aatcgccata 480

ttcctctgtc aaaaatccgt cttttcactt ttgggggcaa cttgcagcac tactgctcag 540

atcaaccagg gcaaaaaatg ccagacaacc tgatgacatt gaatacacat cactgactac 600

agcaggtcta cttcttgcgt atgctgtagg gtcatctgca gacatctctc aacagttcta 660

catgggagat gagaaatata tctcagaccc aagtgcgggt ggattaacct ccaatgcacc 720

tccgaaagga aggaatgtag ttgactggct cgggtggttt gaggatcaag gaggaaatat 780

cactccagat atgtacactt cgctaaaagg gctgtttgct ctttgcaagg gctgcgagat 840

aagaccattg gaaagtatgc caagggagag tttgacaagt gactccattc agatcaaatg 900

ctttactaca tgctgtatta tatataacta tgaaaaaaac taacagagat catggataat 960

ctctcgaaac ttaaggagta tatggggact tacacccatc tagactctgc attgcaagat 1020

gcaaatgaat cagaagaatc tcgagatgaa aagagcaatt ttgatctttt cgatgaggaa 1080

agtaaggagg ttgcaagacc ttcttattat tctgcaattg atgaggagtc tgaccaggag 1140

gaaactgaat ccgatgatcc agatgaggag ctgaatgact caaatgccca tggggcggtg 1200

gatggatggg acgagacgtt gaacgagaat tctcagcctg acgacaatgt ctctgttgag 1260

ttcgctcgta catggtcaac accggtgatg gaatcttcgt cagagggaaa gactttgcat 1320

ttggctatgc cagatggact gaatccagat caagtcgcac agtggctgca gactgtcaag 1380

gctttgtttg agagtgccaa atattggaat ctgtccgaat gcaggatgga agtgctgctt 1440

gagggagtat taatcaaaga gagacaaatg actccagatc ttcagaaggt cacaccgaag 1500

ccgaacaatc ctcctccaga aagtatgcca tgcgatcctc tccctcccgc tatggacgtg 1560

tgggaggccg cgtctcaggt gtatacacta gagcccaagc gggcaaacct ggccccaatg 1620

gatgtaaagc tgaaagatct gttttcatct agggccgaat ttctctcagt cggaggatct 1680

ccccagatga gctggaaaga ggccattata ttgggtctaa gatacaagaa attgtataat 1740

caagctcgcc taaaatattc cctatagggt ataccccata tgaaaaaaac taacagaatt 1800

caaaatgagt tctctcaaga aaatactcgg cctgaaaggc aagaaggagg aaaagtccaa 1860

aaagttggga cttcctcctc cttacgagat gccagcaaac aatgagttcg agccaaatgc 1920

tcctttagat cctgacatgt tcggggcgga acatttggag attgaaagca agtctgccat 1980

gcgttatgag aaatttaagt tctctgtcaa gatcaccctt aggaccaatc gacctttgag 2040

aacttatgat gatgtgtgcc agattctatc caaatgggat gcaatgtatg tcggcatgat 2100

gggtaagcga ccgttctaca aggtattggt cttgatcgga tccagccact tgcaggctac 2160

acctgctata ctctcagatc gtggtcaacc agaatatcat atgtacttgg aagatagagg 2220

attcatcgca cacaggttgg ggttgacacc gccaatgtta agtgggccgg aaagttttag 2280

aagacctttc catgtcggtc tttacagagg gacaattgac attacagtaa atctcatgga 2340

cgacgaatca acggaatcag caccacaggt ttgggatcac ttcaatacca gatatgtgaa 2400

tcatttcctt gagcatgcaa agaggttcgg attggtcctg tccaagaaac caggtggcgg 2460

ctggatatta gatcaagcgg tctgtgcata atgcgaatat aatcatagtc tcatcagacg 2520

attatttata cattattcta ttctctctct tagttggtgg tagctatgaa aaaaactaac 2580

agagttcaaa actctacatc tcaactgcaa aggctatttt tcttaaaaaa acctttaat 2640

acagagtcat cattcaaaaa tgaagatgaa aatggtcata gcaggattaa tcctttgtat 2700

agggatttta ccggctattg ggaaaataac aatttctttc ccacaaagct tgaaaggaga 2760

ttggaggcct gtacctaagg gatacaatta ttgtcctaca agtgcggata aaaatctcca 2820

tggtgatttg attgacatag gtctcagact tcgggcccct aagagcttca aagggatctc 2880

cgcagatgga tggatgtgcc atgcggcaag atggatcacc acctgtgatt tcagatggta 2940

tggacccaag tacatcaccc actcaattca ctctttcagg ccgagcaatg accaatgcaa 3000

agaagcaatc cggctgacta atgaagggaa ttggattaat ccaggtttcc ctccgcaatc 3060

ttgcggatat gcttctgtaa ccgactcaga atccgttgtc gtaaccgtga ccaagcacca 3120

ggtcctagta gatgagtact ccggctcatg gatcgatagt caattccccg gaggaagttg 3180

cacatccccc atttgcgata cagtgcacaa ctcgacactt tggcacgcgg accacaccct 3240

ggacagtatc tgtgaccaag aattcgtggc aatggacgca gttctgttca cagagagtgg 3300

caaatttgaa gagttcggaa aaccgaactc cggcatcagg agcaactatt ttccttatga 3360

gagtctgaaa gatgtatgtc agatggattt ctgcaagagg aaaggattca agctcccatc 3420

cggtgtctgg tttgaaatcg aggatgcaga gaaatctcac aaggcccagg ttgaattgaa 3480

aataaaacgg tgccctcatg gagcagtaat ctcagctcct aatcagaatg cagcagatat 3540

caatctgatc atggatgtgg aacgaattct agactactcc ctttgccaag caacttggag 3600

caaaatccaa aacaaggaag cgttgacccc catcgatatc agttatcttg gtccgaaaaa 3660

cccaggacca ggcccagcct tcaccataat aaatggaaca ctgcactact tcaatactag 3720

atacattcga gtggatattg cagggcctgt taccaaagag attacaggat ttgtttcggg 3780

aacatctaca tctagggtgc tgtgggatca gtggtcccat atggagagaa ttccattgga 3840

cccaatggct tgctgaaaac cgccagcgga tacaaatatc cattgttcat ggttggtaca 3900

ggtgtgctgg atgcggacat ccacaagctg ggagaagcaa ccgtgattga acatccacat 3960

gccaaagagg ctcagaaggt agttgatgac agtgaggtta tatttttgg tgacaccgga 4020

gtctccaaga atccagtgga ggtagtcgaa ggatggttta gcggatggag aagctctttg 4080

atgagcatat ttggcataat tttgttgatt gtttgtttag tcttgattgt tcgaatcctt 4140

atagccctta aatactgttg tgttagacac aaaaagagaa ctatttacaa agaggacctt 4200

gaaatgggtc gaattcctcg gagggcttaa ttacttataa ttacggactt taaatgtatg 4260

aaaaaaacta taacagaagt caaaatggac ttcttacccg ttgaacaaga ggaggactgg 4320

ggttatgcag aagatgattt ctctagctca gattatctag attttgaaga acgaatgaca 4380

tatttaaatc aggctgatta taatctaaac tcaccattga tatctgatga catttattac 4440

ctgagtcgaa aattccactc atatggcatc ccccccatgt ggaacctcaa agaatgggat 4500

ggaccattgg agatgttaaa atcatgtcaa gcagacccga ttccacatga tctgatgcac 4560

aaatggtttg gaacttggtt agaagacttt gatcacgact ctgcacaagg gatagtgttt 4620

ttaagggaag tagacaaaga ggcctccgag acctatgatt tagtggatac ctttttgaaa 4680

aattgggcag ggaaatccta tccttacaaa gcaaaggaga gatacttaga tcagatgaag 4740

atcattggcc ctttgtgtca aaagttcctt gatttgcaca agctgacatt gatcctcaat 4800

gctgttggtc ctgaagagtt gaaaaacctg ttacgaacat ttaagggaag aacgagagat 4860

ttatcgacca aagatccatg cactcggcta cgtgttccca gccttgggcc cgtattcata 4920

tgcaaaggct gggtctatat ccacaagcac aaaattttga tggaccgaaa tttcctgctt 4980

atgtgtaaag atgtcataat aggacgcatg cagaccctat tgtctatgat aggtagatct 5040

gacgatgcat tcactcagca agacttcttc acccttgtaa atatctacag gacaggagat 5100

atcatcttac aagagaaagg aaatctggcc tatgacttaa tcaagatggt ggagcctatc 5160

tgcaatctga aattgatgaa attggcgaga gaatacagac cactgattcc ccctttcca 5220

cattttgaaa atcatgttaa aaatgcagtg gacgaacaat ctaaggtctc gaggaggatc 5280

aaagttctct ttgagctgat tatgggaatc aaaaatgtgg atcttgtcct ggtgatctat 5340

ggatcattta ggcattgggg gcatccattc atagattatt tcgaaggatt aaacaagcta 5400

cataagcagg taaccatgtc gaaggagatt gacacggagt atgcaaatgc tctggcaagt 5460

gatttggcta gaatcgttct gactaaacag tttgactctg ttaagaagtg gtttgtagac 5520

aagacaaaaa tcccctctgc ccatcccttt ttcaagcata tcatggataa cacatggccc 5580

actgccgccc agatccaaga ctttggagac cactggcatg aactgccgtt aatcaagtgt 5640

tatgagatac ctgacctcat cgatccatct atcatctatt cagacaagag ccactcaatg 5700

aaccgatctg aggtgcttgg acatgtgagg agatcccctc atttgccaat accgagcaaa 5760

aaggtactcc agactatgct tgataccagg gcgacaaact gggttgagtt tctagaaatg 5820

gtagacaaac atggtcttga aaaggatgat ttgataattg gactcaaggg gaaagaacgt 5880

gagttaaaat tagcaggtag attttttttca ttgatgtcct ggaagttgag agaatacttc 5940

gttatcacgg aatatcttat aaaaacacat tttgtaccct tgtttaaggg gctgacgatg 6000

gcagatgatt taacttccgt catcaaaaag atgttggata gttcttccgg acagggaata 6060

gacgactact cttcagtgtg ttttgccaat catatagatt acgagaagtg gaataatcac 6120

cagagaaagg aatcaaacgg accagtgttt cgggtgatgg gccaattttt gggataccca 6180

cgtttgattg aacgaaccca tgagttcttt gagaaaagtc tcatttatta taacaacaga 6240

ccggatctaa tgtgggtcaa tgaagacaca ctgattaatc gtacacaaca gcgagtatgt 6300

tgggaaggtc aggctggagg ccttgagggg ttgaggcaaa agggttggag tattctcaat 6360

cttcttgtga ttcagagaga ggcaaaaatt cgaaacacag cagtcaaggt attggcacaa 6420

ggggacaatc aggtcatctg tactcaatat aagacgaaga aatccagaga tcagagtgaa 6480

ctcatcaatg cattagatca aatggtgaaa aacaacaaca aaattatgga ggaaataaag 6540

aagggaacga gcaaactggg actattgatt aacgatgatg agaccatgca atcggctgat 6600

tatttgaatt acggtaaagt tccaatattc cgtggggtaa ttagagggtt agagacaaaa 6660

agatggtccc gggtcacatg tgtgacaaat gatcaaattc caacgtgtgc caatctgatg 6720

gcttctgtct caactaatgc actaacagta gctcattttg cgtctaaccc aatcaattca 6780

atgatacagt acaattactt cggtaacttt tcccgactac tgttgtttat gcatgaccca 6840

gcactgcgaa gatcacttta cgatgtgcag aatgaaatac cgggattgca cagtaagact 6900

ttcaaatatg caatgctata tttggaccca tctattggcg gcgtttcagg gatggcattg 6960

agtagattcc ttatacgtgc attcccggac cctgtaactg aaagcttatc tttctggaaa 7020

tttattcatg accatactga tgatgaatac ctcaaaagct tatcaattgc ctttgggaat 7080

cctgatatag cgaaattccg actagagcat atcagtaaac tgcttgagga tccaacttcc 7140

ctcaatatat ctatgggaat gagtccttca aatcttttga aaaccgaagt taaaaaatgt 7200

ctcattgaaa atagaacatc tatcaggaac gatattatca aagatgccac catctatttg 7260

aaccaagagg aagcaaaatt gaaaagcttc ttatggtcta tcaatccact gtttcctaga 7320

tttttgagtg agttcaaatc tggcaccttc ctgggagtat ccgaaggatt aatcagtcta 7380

ttccaaaatt ctcggaccat ccgaaattcc ttcaagggta agtatcggaa agagctggat 7440

cacttgatcg tgaagagtga aatttcttct ctcaaacatc tgggcggcat tcacttcaaa 7500

ttggggaatg ggaaaatttg gggatgctcg tcatcccaat cagatttgct tagatacaga 7560

tcctggggaa gaaaactggt gggaactaca attcctcatc ctttggaaat gcacggagca 7620

gcgagtccta aagaggctcc ttgcaccttg tgtaactgct ctggcctgac ttacatctct 7680

gttcattgcc cgaaaggaat tacagaggta ttttccagaa gaggaccctt accggcgtac 7740

ctgggttcta agacatcgga gaccacttca attcttcagc cttgggaaaa agaaagtaag 7800

gttcctattg taagacgagc tactagactg agagatgcca tctcatggtt catagaccca 7860

gattctacac ttgctcaatc tattcttgac aacattaaat ctttgacagg ggaagagtgg 7920

ggaggaagac agcatgggta taagagaact ggctctgcat tgcatagatt ttctacctca 7980

cgtatgagca atggagggtt tgcttctcaa agtcccgcgg ctttgacccg attgattgct 8040

acgactgaca ccatgcacga ttatggagac aagaattatg atttcatgtt ccaggcctct 8100

ttgttatacg cacagatgac tacatctata tccagatggg ggcatgtcgg ggcttgcaca 8160

gatcattacc atgtccgttg tgacagctgc attcgagaaa tacaagagat tgaattgaac 8220

actggagtcc agtactctcc ccccgatgtg tcttatgttt tgacaaaatg gcggaacggc 8280

tcaggttctt ggggtactgt caccaaacaa ctcatcccga aagaaggaaa ctggaccgta 8340

ctctcgcctg cagaacaatc ctatcaagtt ggacggtgta tcggatttct gtacggagat 8400

ctagtacata agaaatcaca tcaagcggac gacagttcat tatttccgtt aagcatacaa 8460

cacaaagtga gagggagagg ttttcttgaa ggtcttttag atggaataat gagagctagc 8520

tgttgtcaag tcattcacag gagaagtgtc gcaaccttaa agcgtccggc aaatgctgtg 8580

tatgggggag tcatattctt gattgacaaa ttgagtatgt cagccccatt cttgtcttta 8640

acccgtactg gtcctatcag ggaagaacta gaaaatgtcc ctcacaaaat gccagcgtcc 8700

tacccaacta ataatcgaga tttggggatg accgtcagaa actacttcaa gtatcaatgt 8760

cgaatcattg agagaggaca gtataaatcc cattatccca caatttggtt attttccgat 8820

gtcttatcgg tggactttat tggtcctatg tccttgtcat ctggacttat gagattgtta 8880

tacaagaaca gtctcagtaa gaaagacaaa aatgagctcc gagacttggc aaatctttca 8940

tctcttctca gatcaggaga agaatgggat gatatacatg tcaaattttt ctctcaagac 9000

ttactctttt gttctcagga gatacgacat gcctgtaaat tcgggattat acgagacaaa 9060

gtaagtctag aagtggatca tgggtggggg aaagaagcat atggaggatg tacagtgctt 9120

ccagtgttct acaggtctca gatttataag aaaagtttga ctgtaccccc acgaattcaa 9180

aaccctatca tatctggact ccgcttgggg caacttccta caggagctca ttataagatc 9240

agatcaatca tcatgactct aaagatcaat tatcaggact tcctgtcatg tggagacggt 9300

tcaggggggа tgactgcctg cttgctccgg ttaaacccta atagtcgggg aattttcaat 9360

agtttgctag aattagatgg agcattaatg agaggatcat cccccgagcc acccagtgcg 9420

ctagagacgt tggggagcca aagaactcga tgtgtaaacg gaggaacatg ttgggaacat 9480

ccctctgact tgagcgaccc caatacttgg aagtatttta ttggattgaa gagaggatta 9540

ggcttgcaga tcaatctgat tactatggat atggaagttc gagatccagt gatctcacac 9600

aaaattgaag caaacatccg agcatttctc tatgatcttt tagacccgga gggaaccctt 9660

atatacaaaa cgtatggcac atatctggca gaagaggaaa ggaatattct gacagaagta 9720

ggtcctttgt ttcacactac tgacttggtg caaactattt acagtagtgc ccagacttcg 9780

gaggtttact gtgtatgcag acggttaaag aaatatgctg atcaacaaca tgtggattgg 9840

tcattgttga ctgatggatg gtctcggtta tatgcgtttt ctgtgaatcg attggaattc 9900

caaagggctc agagtcttcg gaaactggac acactgcaag gaattccaag ctttttcata 9960

ccagatcctt ttgtcaatgc ggagacttta ttgcaaattg caggtgttcc aacagggatt 10020

tctcacacag ccgtattaca tggatcgtta cattctgaac aattgataac gcttggtatt 10080

ttcttctgtg cgctaatctc tcaccataca atgaacatca tacgaatatc acctgtcccc 10140

ccgtctcctc catccgatgg gtcaataagt agaatgtgtt ctgcaatcac agggatccta 10200

ttttgggtct ccttagtgga gaaggacttg actctataca actcattgtt gtcaataata 10260

cagagatcct ttccaatccg atggtacaaa aataaggaga aaaacggatg gtcccaatgt 10320

tgggggggcaa atggagacgg gatacccaaa gatactcgac taaatgattc gatggcgaac 10380

ataggaaact ggataagggc tatggagttg ctttgcaata agaccgctca gatgcccttc 10440

tctcccaagt tgttcaatcg attggccgca caatatgaca gagaattaac atggaagaag 10500

gtgttggcta aaacaggact tgcagattta ctaacaggac aaatttcaca aattgatcga 10560

tcagttgcga atgtccggag cgagccgagt aatgagaact cttggcaaga ttagagcgat 10620

ccacaagtat gaaaaaaact aatcccatag ccattttaaa ttattgaaat tgatgaaatt 10680

ggcgtcgacc ggccgcgatt ctggakccga tgcgta 10716

<210> 8
<211> 442
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Carajas*

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Tyr Ile Ser Asp Pro Ser Ala Gly Gly Leu Thr Ser Asn Ala
```

355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 261
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Carajas*

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Tyr Ser Leu
260

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

<220>
<223> *Virus Carajas*

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Cys Ala
225
```

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

<220>
<223> *Virus Carajas*

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Ile Pro Arg Arg Ala
        515
```

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

<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Carajas*

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asp Gln Ser Glu Leu Ile Asn Ala
```

725 730 735

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ile  Ile Met Thr Leu Lys  Ile Asn Tyr Gln Asp  Phe Leu Ser
    1655                 1660                 1665

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

Asn Pro  Asn Ser Arg Gly Ile  Phe Asn Ser Leu Leu  Glu Leu Asp
```

```
    1685                1690                1695

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

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

Cys Trp  Glu His Pro Ser Asp  Leu Ser Asp Pro Asn  Thr Trp Lys
    1730                1735                1740

Tyr Phe  Ile Gly Leu Lys Arg  Gly Leu Gly Leu Gln  Ile Asn Leu
    1745                1750                1755

Ile Thr  Met Asp Met Glu Val  Arg Asp Pro Val Ile  Ser His Lys
    1760                1765                1770

Ile Glu  Ala Asn Ile Arg Ala  Phe Leu Tyr Asp Leu  Leu Asp Pro
    1775                1780                1785

Glu Gly  Thr Leu Ile Tyr Lys  Thr Tyr Gly Thr Tyr  Leu Ala Glu
    1790                1795                1800

Glu Glu  Arg Asn Ile Leu Thr  Glu Val Gly Pro Leu  Phe His Thr
    1805                1810                1815

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

Val Tyr  Cys Val Cys Arg Arg  Leu Lys Lys Tyr Ala  Asp Gln Gln
    1835                1840                1845

His Val  Asp Trp Ser Leu Leu  Thr Asp Gly Trp Ser  Arg Leu Tyr
    1850                1855                1860

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Ser Trp Gln Asp
2105

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

<220>
<223> *Virus Bahía Grande*

<400> 13
acaatattag ataaactcct ctacttctta actatcgtta gacatggccg ccgcaatact 60

tccagtttct cgtaacatgc ctgtcagaga aaggacagtg gcaggaagtg taacagcgcc 120

accagttcag tatccaagca cctggttcca agcccatgcc ggacaaaaag tttcaataac 180

tatttatcaa aatactaatg cacgacaagc tttctccaga attactcaac tcagaaacaa 240

cggacaatgg gatgataaat tgatcgctac tttcatgaaa ggtgtcttgg atgaaaatgc 300

tgaatggttc caaagccctc ccctcattga ggactggatt gtaaatgaag cagtcatcgg 360

aagagtagat gacgtagttg cacccactgc acttgcacag tgggaagagg ttgaaaggcc 420

tcaaaacatg gatccagtac ccaatgagga aggagaactg gggactcgga ggtcattttt 480

cttggcatta atcaccatct acaggcaagt actgacaaga accatcaatg tggactacgg 540

ccaagaagtg agcagaagga taatagataa tttcaaagaa caacctttag gtatgtcaca 600

ggatgacata aatgaaatcc aggggtatga atcaaaagaa aggctaacta caaattatgt 660

gaaaatctta tgcatccttg atatgttctt caataagttt cagacccatg acaaaagcac 720

catcaggata gctactttac caacaagata tagaggatgt gctgcattca cttcatacgg 780

agaactagca ataagattgg gaattgaacc cataaagctg cccagtttga ttcttacagt 840

agcagtggcc aaagatttcg ataagatcaa tgtcaatgga gagcaagcag agcaattaga 900

tggatatttt ccatatcaat tagagttggg attagttaaa aagagtgctt attcagcagg 960

aaattgtcca tctttatact tatggatgca caccatagga acaatgctcc atcaacaaag 1020

atcttatcga gccaatgttc ccaaaaatgt accagaccaa atgggaacaa taaattctgc 1080

aattgctgtt gccatgcagt ttgttgctgg gggagagttc agtatgcaat ttgtagggga 1140

tgcacgagtt caagaagcca tgagagaaat gcaaacagca gaagctgaat tgaatgagtt 1200

aagaatggct caggcaagag aaatgagagc tgcagcaaga ggagatgaag atgaagaagg 1260

ctctgaagat ggacttgatg atgaaaatga tggagaaggg gatgatgagt taccagctga 1320

aattgaacaa aatcctgaat atttaaatag agtcaacagg atcagagaat tacaagaaaa 1380

cctccaacaa tacaacgcaa cagtacaaca gcacactaat gcggtagaaa aagccgcact 1440

cagagcactc gcttatcttc aagaaaatgg aggaattgca gataaggaca agagagactt 1500

gggtataaga ttcaggaggt ttgctgatga agcggaaggt agagtcggta aattattagc 1560

cagtttgttc cctgccccga gataaatatt ctttcaggta tcattttctt atttttaaaa 1620

tattttatcc agattttaat ttctttatct actgtattat tttattcaaa tatgttttca 1680

attaattttt tcttctttat atgttatatt ctatacatat gttaatgttc atgaaaaaaa 1740

caacaaatct cataagatac tcgtttaaag aaatggctta ttcaactggt ttgattaaag 1800

gtgaagtgtc ccaaggattg tctaatgcat ttaaagatgc aggaatacat caaatagaat 1860

taaataaaga atatgacaat ttatcaattt tgggggccaa catgagtgca ttgaataaaa 1920

tgtttgacac agaagatgaa gggttatctg atactaatac taactcatca aaaaactcta 1980

ttttacaagc gagtgatatg ttcataggaa atgatgaata tgaatcagat gactctcatc 2040

attttctaag ctcacctagt ccagataaag gaagcagtga agaaggaagc aacctccaag 2100

aattcaattt tcagatacct agaaacaagg ttggaaaaga aaaggcatac aggaggggag 2160

tcattgatgt attggatttt ctacagagac acagatttat agaagaattc cgtatggaag 2220

gacttaatga ggatatagtc tgtatcatcc ctacaagagg aatgatcccc acaaaaacac 2280

cccctaccct ggatgacaaa attcatcttg ctaacgatca gtcaatagaa aaagaagaaa 2340

tcctccaaaa agacaagaca tcaaaaccaa acaaaggaat caaacagcca aacaagcaag 2400

aggcacaacc agtctctgaa tctcaaacag gaatgaagga agacaaaaaa gaacaaaagc 2460

caaagcaaaa ccaaattccc attaaaaaca aacaggaaaa tgaagactca aaagaagttg 2520

ctaagaccaa caaagataaa gaaaataaag tcagcaaagg aagtatgtca aagaatgaca 2580

aactaaaaga aggcaatata actgttccaa aacagggatt tgaaaagaag aaaacaaaac 2640

aaataaatga agaaggccac aaatcatttg attatgctaa tacatatggg acaaaagtca 2700

ctgtgaaaac tataaggtat tgtaagacat gcaatcctaa tactagaaaa aatgctacag 2760

tatatcttga ccatctttat gaacgccaca gtcatgaggt tgctttgatt aahagcttgg 2820

cttaccctct tttattttwt ttwwggttga wttaaattaa ctaattagat actttyttaa 2880

tacatgawaa wwacaacaaa tctaataaat tacattgaaa caaagatgtc tggtgtgatg 2940

agtatattta aaaggaagga caagaaaggg aatgagggtt ccaaagccct agccatacca 3000

gatgaaaaat cagtagtccc atctgcacct ccagacatct cagctatgga ttatgggagg 3060

tttggtttat tagggaggca aactctatta gaagaagatg aggaagaatc tagatgcatc 3120

actattatag atctagaagt cgatctacag atagaggtgt tatctaatag agaaactcga 3180

cttgtaatag acttgattgc tcctttgtgt aatcttcaaa ctgattacat tggaaaagag 3240

aacacaaaag caatttggat aggattaact gtagtagcag cttttggagt gaaaagaacc 3300

attaagacaa aaaatcatca tgtatataaa gggtgtgtct ccagtggact taggctttta 3360

atagactcag aaaaacaatt tgagctagat aagaggaata aatgstctca gcatctcagt 3420

tatctcacca atggtgtaaa aacagagtgg gccataagag gggagatgat caggacaaga 3480

gtaccttacc ttcctcagcc aggaagtgag gatgtgctta tgtttttagc agggatggga 3540

ataagttgtt attcaaatcc agatggtcat ttagtcctca aagtttgaaa aataacaaaa 3600

ttctttagag atcatattca gtatttatac cttagtaata ttgtggctca gatttaatga 3660

tgggagtgcc taaagtattt caattttggg ttagaatcag gacatgaaaa aaacaacaaa 3720

tctaattaac tatcatttag tacttagaac gaacttatct tctgttgaat catgatttcg 3780

aatatgtttt tcttgtttca actctcatta tttctacagt ttatagcagg agatgagtca 3840

ttagaaacaa taacagcccc tgaaactcct gaccctatac tcttaaaagg agatacaaaa 3900

tatctgttct tagtcccttc ttctgtcaaa aattggaaac cagctgacct gaatgaatta 3960

acatgccccc ccctaatctc gaaaccagat acttctgaaa tgacttattt ttccacagat 4020

gtgatggagt tacaaaaaca tcatgaattg gcaccagtag aagggtattt atgttcgggt 4080

ttgcgttaca aagtaatatg ttctgaagga ttttttggac aaaaaacaat agcaaaaaag 4140

attgagaaca ttgaacctga tagtaaacaa tgccttgatg acttgtcaaa atttaagaat 4200

gatgattacc tactcccata tttcccttct gaagattgta attggatgaa agagactccc 4260

acccataaag attttatagt ttttcaaaaa cattttgtta aatatgaccc atacaataat 4320

ggtttttatg atcctttact taaaaaagac tactgtgata ctcaagtctg tgagacagaa 4380

catgatcaaa ctatttggat aacagaaaag agtattgaaa atgaatgcat cttcaattat 4440

ccgattaaaa agcatatatt ccatacagct gactttggga aaatgataat agattacgaa 4500

ttaaatcaat ggacttcagt ggaagatggg tgtttaatta actattgtgg aagagaggga 4560

ataaggttat ctaatgggat gttctttgta ggtaagttct ataaaaatct caataattta 4620

cagacctgta gtgctggaac aaaggtcagt tacaagcctt taacctccaa gctggaagaa 4680

attgaaaatg aaatcattct agatcaggaa agattattat gtcttgattc aattaggcaa 4740

atgacagcaa caaaaaaatt atcattttat tctttatcct ttctagaacc aaaatcttct 4800

agtaggcaca aggtctttag aattcataat aaaacactag aatataccga aaccgaatgg 4860

catccaatca tgtcgtttaa ttttgatgaa ccaaacaaaa ttggaattga caagaatggt 4920

aaatcagttt attggaatga atgggttcct agtggaatat ctgggctgtt atcagggttc 4980

aatggagtct acaaaaaaga aaatgaaact aaagtaacta ttgcccgatt agaaacaata 5040

aaagaagatt atgataggga gatgatgata gatcacgagt tggtagaggt agaacatcct 5100

aaaattgtac acttaaaaag agagaacatc acaggatcta gagtcgaaat tgttaataaa 5160

gaacattctg atgtgagtgg ttggctgtca tcagtattga gtagtttttg gggaaaaatc 5220

atgatgacaa taataagtat aatcttaatc gtaataatag gattagtttt aataaactgc 5280

tgcccaatta tatgcaaatc atgtattaaa cgttataaaa caaaggaaga atcccgcaat 5340

agacatagat tggatagaga agataacggt agattgagga ggcaacatcg agttattttt 5400

aacaatcaat ccaatgatga agaaaatgcc attgaaatgg tagaatatac tgacactccc 5460

aggccattgc gaccgattcc tgatgccaca acatcagaca ctgagtcaag atcccccaca 5520

acagcccata gttttttcaa ccgttaaaaa ggtaggttat attatacttt tctctatacc 5580

tctaatagtc atcatcgtgt tttttgtgtt attagataga aaacatctca aatatatacc 5640

tttaaaggca tggaacactt caataattac aattaaagaa ccttattaaa attaaaaagt 5700

tttctttaaa ataattctcc taattgattt taatttcatg aaaaaaacat taahaaatct 5760

aagtatmact saaatttagg gtatgcttgg tgtgttaaaa tggatttctc ttatgaacaa 5820

ttgctggatc ctatagatgt cttagaagaa gaattatatg aatttgattt cgaatatgat 5880

gattacactg atgatgatca gacaccctta cccaatatta agtacaaaaa cctagaaggt 5940

aaagactata atttaaactc acctctcatc agcgatgtga tcgattcagg aagagaatac 6000

ataattaatt ctaaaaagta cttttctcat gaaagaacaa atccggagtt ggaacaattt 6060

agtaaagctc taatggctat tgggttttct agatttgatt tacgaaaatc atcagaacat 6120

cataggtaca tgagttcata tatatatgga aatgagaaaa aacatatgaa aatcgaaata 6180

atacccagat ggaaagaagt cttagaactg actcgcaatc ctgtagaagt aacctctcat 6240

aagatattgg gatcaaaatc acaatctgat caagaaggat atataaatag attgcgatat 6300

attacagtag atggacctca tgcaagaaaa acaagattac accaagaatg ggaaaaattc 6360

tcaacattac attatataac gtatattatg aattcaaaag cctttagtga caacaaaaat 6420

tgggtgaggg aagtctttga gaccatagaa actagtgaag ttgaccctga aataattaca 6480

ataattggaa caggtttatc aaagaaagaa gtatcctgga ttatatctga gaactttgca 6540

ttaaatgtta gaacaggttt atttgtctcc aaagatttct tgctgatgat taaagatgtc 6600

accttagcta gatgtatgag caaactgagt atgattaaca gaaagtctcc caacacaact 6660

tatgatatga taaaattttt ggatagtcta tatgaaagtg gtgacaaaat attgacaaga 6720

catggaaatt tagcttacaa gcatatcaag ttattggagg cagcttgtct agagagatgg 6780

aatcaattag ggcacaaatt tcgaccattg ataccaatct cttcaagcat gagtgatcat 6840

cttagaactc aattagaaga aaatcaagat ctctatatgg tgagtaggga attcttcgat 6900

ttgattggaa agattgaaga tccttgggtc gttgctcaag cgtatggaac attcaggcat 6960

tggggacatc catacattga ttatttaaat ggtctaaaag atctagaaaa aagagtaaat 7020

gaaaatatca aaattgataa aaattatgca gaaaaattgg ctagcgatct tgcgtttata 7080

gttctaaaag accaatttgg aaaacataaa agatggtttg ctaaacctaa taaagaattg 7140

gatgaaaata atcccatgcg aaaatgcata gaaaacaatg tgtggcctaa cactaaagtt 7200

attttagact tcggagacaa ttggcataaa ttagaattat taccatgttt tgaaatccct 7260

gatgcaatag acctttctga cctatatagt gataaagctc attccatgca atacagtgaa 7320

gtattaaatt atgtaaaata caaaaaatcc aaaaagaata tccctgcctt acgtgttatc 7380

gggacattat tagaaaagga aaatccaaat ataaaagaat ttttacaaaa aataaacgat 7440

gaaggtttag atgatgatga tctgataata gggctgaaag caaagaaaga gaactgaaag 7500

ataaaggaag atttttctct cttatgagtt ggaatattag gttatatttt ktgattacag 7560

aatatttaat twwwttwcaw ttttktmcca ttgttttctg gcttaacagt agcggatgac 7620

ttaaatactg dcmsmmamrr attmttaagt gctacagaag gacaaggtct agatgactat 7680

gaaagggtct acatagcaaa tagtttagat tatgaaaaat ggaacaacag gcagcgttat 7740

gaatctaatg aaccagtatt cacagtaatg gggaaatttt taggttatcc aaacttaata 7800

tcgtatactc ataagatttt tgaaagatca tttatctatt ataacggaag actagactta 7860

atgggagtag atggttacca tatttataat ttatttgatg ataaaatggt ctgttggcat 7920

ggtcaattgg gaggatttga aggtgtaaga caaaagggct ggagtgtttt aaattactta 7980

attttgcgaa gagaagctgc aacacgaaat actgcaccga aatttttagc ccaaggagac 8040

aatcaaattg tcattactca gtatacattg accagtaaaa gcactcaagc tataattgaa 8100

cgagaattga ggaatatttg ggaaaacaat gctcatataa tgcataggat acaacaagcg 8160

acaagtcgaa ttggattagt cataaataat gatgaagtgt taacttccgc agagttattg 8220

gtttacggta aaataccagt atttcgaggg aaattgttac ctttagaaac aaaaagatgg 8280

tctagagtca gtaccgtgac aaatgaacag ataccatcct tttctaattc attggctagt 8340

agtacaacta ctgctttggc ggttaatcaa cactcagaaa atcctatcga ggttatatct 8400

caacatcatt tctttagttc ttttgctggc acattagtaa catttgttaa tcctatctta 8460

ggttttgatc cgattaaata ttctcaattg tcagagagaa ataagaagtt attcttatta 8520

aggcttattt acaaagatcc aagtgttggg ggagtttgtg gaactaattt attaaggttt 8580

tttatatcaa gatttcctga tcctttgaca gagacattga catggtggaa aatattggtt 8640

gagaattcta aagataaaga ggttgttaaa attgcgctag aatgtggaaa tcctaagttt 8700

ggagggatta atgataagac attagctatg ttactcgaag accctatgtc actaaatata 8760

ccaggaggac tctcaagtga cacgatgata aaaaacaaaa tttatgaagg tcttattcat 8820

caaatggggc ttaaattgat caaaaatgaa ttggttgtag aatctctaac cttctataat 8880

gattacaaag cacaatttgt aagatggtta ttctccataa gaccaatttt cccacgattc 8940

attagtgaat tttatacatc tacttatttt tatataacag aaagtgtcct tgccatattt 9000

caaaattcta gaaccattag aaaagttttc tcaaaaagat ttccgaaaga ggtttatctc 9060

acgatagtta aaggagaaca aatgtctata gatagcttat tgacaaccaa aagagggatt 9120

gttagggagg ctatttggaa atgttcagca acgaaagcag atgaaatgag aaaactatca 9180

tggggtagag atatggttgg aataacaaca cctcatccag ctgaattcac acaagaatta 9240

ttatgttcag acgggtgttc agaacctcac attgtagcca aaaaggttat ttactctgat 9300

agaaaattat ggactaaggg taagatgatg ccttaccttg gtactaaaac caaagagtcc 9360

acaagtatac ttcaaccatg ggaaaaaaga ttagagattc cattattgag gaaagcatgt 9420

gatttaagaa aagccattag gtggtttgta gaagataatt caaacttagc aaaatccatt 9480

tataaaaatt tagaaagtat gacaggaatt gatttaagag aagaacttcg aaactataaa 9540

agaactggta gtagcaaaca tagattaaga aactcgagag tctccaatga aggtaatccc 9600

gccataggtt ataataacct aacgtatgtc acagtaacaa ctgatagttt aggaaatatt 9660

aattccgaaa attatgattt catgtatcaa tctatcttat gctggtgtgg tgtattatcg 9720

tccctagcaa ccaatcgata tcgagaccat gagactactc attttcatct taaatgtaat 9780

gattgcttca gattggttaa agaggaaata ttagaggctc cttcagttta cccatttcct 9840

aatgtaagat cctctgtaag gagaatgctt acacaggata ttaaattaaa atatctgcca 9900

cgaatttctg cccctgatga aaacacctgg gatactctgg atgttgatca aaaaagttgg 9960

catattggga gagctcaagg gtttttgtgg ggattaaatg tatttaccaa aaccactaaa 10020

gaggttgagg gtgacatttt cccaacttcc ataacgaaaa aagtcgaacc agaaaattac 10080

atggatggtt tacacagagg gttttgttta ggagctactc tctcccccat gtacacaaga 10140

tatggatcac tcagcaggat ggctagaaga aaattcgaag gagcatactg ggaaatcgta 10200

gatgaagcaa tgaaaactaa tctaccaaat atgattgatc amaaaaattt caaacctttc 10260

ctgagaagga caggaggtga tctaattaaa tcttatcctg cacgaaagga agagttggta 10320

cttgttttaa agaaatggtt cttacataaa atggtctctg aaagaaaaaa caattccata 10380

tgggaaagta aaagagtaat tgcctttgct gacatggaca ctgaatttgt attgtgtctc 10440

ttcagattag cggaaagcat actgaattgt tatcaaaatg aagctttatc tgctggtcag 10500

gctagggtct tagggaatgc aaaagagaca atagatctga tctcaaaata caataactca 10560

aacattaatg cagatgagat tgagcgattg cagcagatat tgatggcttc tgacctgaaa 10620

gatcatgaag ttgtagattc acaagctagg catgctgctt ctgacttacc tgaattggca 10680

aaatcagaaa attacaatga agtgattaaa tatgtagaat ttagaggtta tggtggtaaa 10740

accataagat tagaatatca acctagtgat ttgatagact ggaagggagg aatggttcaa 10800

gacctacaag tacctagatt gaagaaccct ttaatttctg gagtcagagt agtgcaatat 10860

agcacaggag ctcattataa atataaagat atagaaagag aatttcaaat tgctggtgat 10920

ggtatattcg ctggtgatgg ttctggtggt atgggtgcaa accatctgag attacataaa 10980

tcagcccgcg ttatatttaa ctctaaatta gagttagaag gagaatcttt aaaagggtta 11040

gcccctgcag gacctggagc ttacacggtc tcaggtgaag atgttgtgga aagatgtgtc 11100

aattacacaa cttgctggga agaagcttct gatctgagtg acgaaaaaac ttggaagaat 11160

ttttttaggc tcataaaaga gtactcatta gatatagaag tgttttgctg tgatgctgaa 11220

gtccaagacc catatatcac aaacaaaatt gaatctaata tattgaaata catatctttg 11280

atccttaata aaagaactgg aactttaatt tacaaaactt atttcaatag attattggat 11340

cccaatacta taacccactt tttgggaatg tttttccata gatgttacgg atttctccct 11400

actactcaag gatcctttac ctctgaaatt tacattgtct gtcaatatcc aaagacactt 11460

gactctacaa gcaaaacaga gttaacctat actagtttat ttaatattta tcagaacata 11520

agagtgatgg aaacttatca aaatgaattt gatagagcat gtagtttatt gttttctgat 11580

atgacggaag gtcttattga taaaacacca tttttagatc ctgaagaatt ggctattttc 11640

ctgacaacag tgggattgga tacggggtgg gctttactaa tagcagaaca attacagata 11700

tcttgctcaa acaaattaca tccaataatc atattatgga ttttaggctt tataatttcc 11760

agacacttag tgagtataac atcttggttt cgtagaggaa caaaattccc tccttctatc 11820

cagttgcaaa aaatgttagc tgctctattt ggaatctggt atggagtctc ttatattatg 11880

aatgatgcag agagttactc aaggatttct gtattgtaca atcaagagat ttatttctca 11940

ttaggcttga ctaatatggt atataggaaa aaagatgaca tggaattggg tcaattttca 12000

acttggaaga taggacctgg tgataatagt aaactcatag atataggtcc caaagcgggt 12060

ataactcaga caatgataag agctattgta gtcttgtata aaggagaaca tataacttct 12120

attgtgacta aggaagataa agtagaagga gatagaattt taagcttatt tggaaaagga 12180

ttgaatctta aaactttaat ggagcgaaca ggaataaatt atttgcaaat aggggaaaga 12240

aatcctcaag aaattccata tacgttagag gaagaagtat tggaagaagt ggtagaagaa 12300

aatacaggag aatttgatca atcataaaca gataaaggaa atraaaaaaa aaaaaatata 12360

tattgaaata ataaagctta aagaacaaga tcttgaaatt gtgaactact aagtat 12416

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

<220>
<223> *Virus Bahía Grande*

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Pro Tyr Gln Leu Glu Leu Gly Leu Val Lys Lys Ser Ala Tyr Ser
    290                 295                 300

Ala Gly Asn Cys Pro Ser Leu Tyr Leu Trp Met His Thr Ile Gly Thr
305                 310                 315                 320

Met Leu His Gln Gln Arg Ser Tyr Arg Ala Asn Val Pro Lys Asn Val
```

325 330 335

Pro Asp Gln Met Gly Thr Ile Asn Ser Ala Ile Ala Val Ala Met Gln
340 345 350

Phe Val Ala Gly Gly Glu Phe Ser Met Gln Phe Val Gly Asp Ala Arg
355 360 365

Val Gln Glu Ala Met Arg Glu Met Gln Thr Ala Glu Ala Glu Leu Asn
370 375 380

Glu Leu Arg Met Ala Gln Ala Arg Glu Met Arg Ala Ala Ala Arg Gly
385 390 395 400

Asp Glu Asp Glu Glu Gly Ser Glu Asp Gly Leu Asp Asp Glu Asn Asp
405 410 415

Gly Glu Gly Asp Asp Glu Leu Pro Ala Glu Ile Glu Gln Asn Pro Glu
420 425 430

Tyr Leu Asn Arg Val Asn Arg Ile Arg Glu Leu Gln Glu Asn Leu Gln
435 440 445

Gln Tyr Asn Ala Thr Val Gln Gln His Thr Asn Ala Val Glu Lys Ala
450 455 460

Ala Leu Arg Ala Leu Ala Tyr Leu Gln Glu Asn Gly Gly Ile Ala Asp
465 470 475 480

Lys Asp Lys Arg Asp Leu Gly Ile Arg Phe Arg Arg Phe Ala Asp Glu
485 490 495

Ala Glu Gly Arg Val Gly Lys Leu Leu Ala Ser Leu Phe Pro Ala Pro
500 505 510

Arg

<210> 15
<211> 353
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Bahía Grande*

<400> 15

Met Ala Tyr Ser Thr Gly Leu Ile Lys Gly Glu Val Ser Gln Gly Leu
1 5 10 15

```
Ser Asn Ala Phe Lys Asp Ala Gly Ile His Gln Ile Glu Leu Asn Lys
            20                  25                  30

Glu Tyr Asp Asn Leu Ser Ile Leu Gly Ala Asn Met Ser Ala Leu Asn
        35                  40                  45

Lys Met Phe Asp Thr Glu Asp Glu Gly Leu Ser Asp Thr Asn Thr Asn
    50                  55                  60

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

Asp Glu Tyr Glu Ser Asp Asp Ser His His Phe Leu Ser Ser Pro Ser
                85                  90                  95

Pro Asp Lys Gly Ser Ser Glu Glu Gly Ser Asn Leu Gln Glu Phe Asn
            100                 105                 110

Phe Gln Ile Pro Arg Asn Lys Val Gly Lys Glu Lys Ala Tyr Arg Arg
        115                 120                 125

Gly Val Ile Asp Val Leu Asp Phe Leu Gln Arg His Arg Phe Ile Glu
    130                 135                 140

Glu Phe Arg Met Glu Gly Leu Asn Glu Asp Ile Val Cys Ile Ile Pro
145                 150                 155                 160

Thr Arg Gly Met Ile Pro Thr Lys Thr Pro Pro Thr Leu Asp Asp Lys
                165                 170                 175

Ile His Leu Ala Asn Asp Gln Ser Ile Glu Lys Glu Glu Ile Leu Gln
            180                 185                 190

Lys Asp Lys Thr Ser Lys Pro Asn Lys Gly Ile Lys Gln Pro Asn Lys
        195                 200                 205

Gln Glu Ala Gln Pro Val Ser Glu Ser Gln Thr Gly Met Lys Glu Asp
    210                 215                 220

Lys Lys Glu Gln Lys Pro Lys Gln Asn Gln Ile Pro Ile Lys Asn Lys
225                 230                 235                 240

Gln Glu Asn Glu Asp Ser Lys Glu Val Ala Lys Thr Asn Lys Asp Lys
                245                 250                 255

Glu Asn Lys Val Ser Lys Gly Ser Met Ser Lys Asn Asp Lys Leu Lys
```

260 265 270

Glu Gly Asn Ile Thr Val Pro Lys Gln Gly Phe Glu Lys Lys Lys Thr
275 280 285

Lys Gln Ile Asn Glu Glu Gly His Lys Ser Phe Asp Tyr Ala Asn Thr
290 295 300

Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Lys Thr Ile Arg Tyr Cys Lys Thr Cys
305 310 315 320

Asn Pro Asn Thr Arg Lys Asn Ala Thr Val Tyr Leu Asp His Leu Tyr
325 330 335

Glu Arg His Ser His Glu Val Ala Leu Ile Lys Ser Leu Ala Tyr Pro
340 345 350

Leu

<210> 16
<211> 220
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Bahía Grande*

<220>
<221> misc_feature
<222> (160)..(160)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 16

Met Ser Gly Val Met Ser Ile Phe Lys Arg Lys Asp Lys Lys Gly Asn
1 5 10 15

Glu Gly Ser Lys Ala Leu Ala Ile Pro Asp Glu Lys Ser Val Val Pro
20 25 30

Ser Ala Pro Pro Asp Ile Ser Ala Met Asp Tyr Gly Arg Phe Gly Leu
35 40 45

Leu Gly Arg Gln Thr Leu Leu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Ser Arg Cys
50 55 60

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

Asn Arg Glu Thr Arg Leu Val Ile Asp Leu Ile Ala Pro Leu Cys Asn
85 90 95

Leu Gln Thr Asp Tyr Ile Gly Lys Glu Asn Thr Lys Ala Ile Trp Ile
100 105 110

Gly Leu Thr Val Val Ala Ala Phe Gly Val Lys Arg Thr Ile Lys Thr
115 120 125

Lys Asn His His Val Tyr Lys Gly Cys Val Ser Ser Gly Leu Arg Leu
130 135 140

Leu Ile Asp Ser Glu Lys Gln Phe Glu Leu Asp Lys Arg Asn Lys Xaa
145 150 155 160

Ser Gln His Leu Ser Tyr Leu Thr Asn Gly Val Lys Thr Glu Trp Ala
165 170 175

Ile Arg Gly Glu Met Ile Arg Thr Arg Val Pro Tyr Leu Pro Gln Pro
180 185 190

Gly Ser Glu Asp Val Leu Met Phe Leu Ala Gly Met Gly Ile Ser Cys
195 200 205

Tyr Ser Asn Pro Asp Gly His Leu Val Leu Lys Val
210 215 220

<210> 17
<211> 591
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Bahía Grande*

<400> 17

Met Ile Ser Asn Met Phe Phe Leu Phe Gln Leu Ser Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15

Phe Ile Ala Gly Asp Glu Ser Leu Glu Thr Ile Thr Ala Pro Glu Thr
20 25 30

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Lys Gly Asp Thr Lys Tyr Leu Phe Leu Val
35 40 45

Pro Ser Ser Val Lys Asn Trp Lys Pro Ala Asp Leu Asn Glu Leu Thr
50 55 60

Cys Pro Pro Leu Ile Ser Lys Pro Asp Thr Ser Glu Met Thr Tyr Phe

65 70 75 80

Ser Thr Asp Val Met Glu Leu Gln Lys His His Glu Leu Ala Pro Val
85 90 95

Glu Gly Tyr Leu Cys Ser Gly Leu Arg Tyr Lys Val Ile Cys Ser Glu
100 105 110

Gly Phe Phe Gly Gln Lys Thr Ile Ala Lys Lys Ile Glu Asn Ile Glu
115 120 125

Pro Asp Ser Lys Gln Cys Leu Asp Asp Leu Ser Lys Phe Lys Asn Asp
130 135 140

Asp Tyr Leu Leu Pro Tyr Phe Pro Ser Glu Asp Cys Asn Trp Met Lys
145 150 155 160

Glu Thr Pro Thr His Lys Asp Phe Ile Val Phe Gln Lys His Phe Val
165 170 175

Lys Tyr Asp Pro Tyr Asn Asn Gly Phe Tyr Asp Pro Leu Leu Lys Lys
180 185 190

Asp Tyr Cys Asp Thr Gln Val Cys Glu Thr Glu His Asp Gln Thr Ile
195 200 205

Trp Ile Thr Glu Lys Ser Ile Glu Asn Glu Cys Ile Phe Asn Tyr Pro
210 215 220

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

Asp Tyr Glu Leu Asn Gln Trp Thr Ser Val Glu Asp Gly Cys Leu Ile
245 250 255

Asn Tyr Cys Gly Arg Glu Gly Ile Arg Leu Ser Asn Gly Met Phe Phe
260 265 270

Val Gly Lys Phe Tyr Lys Asn Leu Asn Asn Leu Gln Thr Cys Ser Ala
275 280 285

Gly Thr Lys Val Ser Tyr Lys Pro Leu Thr Ser Lys Leu Glu Glu Ile
290 295 300

Glu Asn Glu Ile Ile Leu Asp Gln Glu Arg Leu Leu Cys Leu Asp Ser
305 310 315 320

```
Ile Arg Gln Met Thr Ala Thr Lys Lys Leu Ser Phe Tyr Ser Leu Ser
                325                 330                 335

Phe Leu Glu Pro Lys Ser Ser Ser Arg His Lys Val Phe Arg Ile His
            340                 345                 350

Asn Lys Thr Leu Glu Tyr Thr Glu Thr Glu Trp His Pro Ile Met Ser
        355                 360                 365

Phe Asn Phe Asp Glu Pro Asn Lys Ile Gly Ile Asp Lys Asn Gly Lys
    370                 375                 380

Ser Val Tyr Trp Asn Glu Trp Val Pro Ser Gly Ile Ser Gly Leu Leu
385                 390                 395                 400

Ser Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Lys Glu Asn Glu Thr Lys Val Thr
                405                 410                 415

Ile Ala Arg Leu Glu Thr Ile Lys Glu Asp Tyr Asp Arg Glu Met Met
            420                 425                 430

Ile Asp His Glu Leu Val Glu Val Glu His Pro Lys Ile Val His Leu
        435                 440                 445

Lys Arg Glu Asn Ile Thr Gly Ser Arg Val Glu Ile Val Asn Lys Glu
    450                 455                 460

His Ser Asp Val Ser Gly Trp Leu Ser Ser Val Leu Ser Ser Phe Trp
465                 470                 475                 480

Gly Lys Ile Met Met Thr Ile Ile Ser Ile Ile Leu Ile Val Ile Ile
                485                 490                 495

Gly Leu Val Leu Ile Asn Cys Cys Pro Ile Ile Cys Lys Ser Cys Ile
            500                 505                 510

Lys Arg Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Ser Arg Asn Arg His Arg Leu Asp
        515                 520                 525

Arg Glu Asp Asn Gly Arg Leu Arg Arg Gln His Arg Val Ile Phe Asn
    530                 535                 540

Asn Gln Ser Asn Asp Glu Glu Asn Ala Ile Glu Met Val Glu Tyr Thr
545                 550                 555                 560

Asp Thr Pro Arg Pro Leu Arg Pro Ile Pro Asp Ala Thr Thr Ser Asp
                565                 570                 575
```

Thr Glu Ser Arg Ser Pro Thr Thr Ala His Ser Phe Phe Asn Arg
580 585 590

<210> 18
<211> 2175
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Bahía Grande*

<400> 18

Met Asp Phe Ser Tyr Glu Gln Leu Leu Asp Pro Ile Asp Val Leu Glu
1 5 10 15

Glu Glu Leu Tyr Glu Phe Asp Phe Glu Tyr Asp Asp Tyr Thr Asp Asp
20 25 30

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

Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp Val Ile Asp Ser Gly
50 55 60

Arg Glu Tyr Ile Ile Asn Ser Lys Lys Tyr Phe Ser His Glu Arg Thr
65 70 75 80

Asn Pro Glu Leu Glu Gln Phe Ser Lys Ala Leu Met Ala Ile Gly Phe
85 90 95

Ser Arg Phe Asp Leu Arg Lys Ser Ser Glu His His Arg Tyr Met Ser
100 105 110

Ser Tyr Ile Tyr Gly Asn Glu Lys Lys His Met Lys Ile Glu Ile Ile
115 120 125

Pro Arg Trp Lys Glu Val Leu Glu Leu Thr Arg Asn Pro Val Glu Val
130 135 140

Thr Ser His Lys Ile Leu Gly Ser Lys Ser Gln Ser Asp Gln Glu Gly
145 150 155 160

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

Lys Thr Arg Leu His Gln Glu Trp Glu Lys Phe Ser Thr Leu His Tyr
180 185 190

```
Ile Thr Tyr Ile Met Asn Ser Lys Ala Phe Ser Asp Asn Lys Asn Trp
        195                 200                 205

Val Arg Glu Val Phe Glu Thr Ile Glu Thr Ser Glu Val Asp Pro Glu
    210                 215                 220

Ile Ile Thr Ile Ile Gly Thr Gly Leu Ser Lys Lys Glu Val Ser Trp
225                 230                 235                 240

Ile Ile Ser Glu Asn Phe Ala Leu Asn Val Arg Thr Gly Leu Phe Val
                245                 250                 255

Ser Lys Asp Phe Leu Leu Met Ile Lys Asp Val Thr Leu Ala Arg Cys
            260                 265                 270

Met Ser Lys Leu Ser Met Ile Asn Arg Lys Ser Pro Asn Thr Thr Tyr
        275                 280                 285

Asp Met Ile Lys Phe Leu Asp Ser Leu Tyr Glu Ser Gly Asp Lys Ile
    290                 295                 300

Leu Thr Arg His Gly Asn Leu Ala Tyr Lys His Ile Lys Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320

Ala Ala Cys Leu Glu Arg Trp Asn Gln Leu Gly His Lys Phe Arg Pro
                325                 330                 335

Leu Ile Pro Ile Ser Ser Ser Met Ser Asp His Leu Arg Thr Gln Leu
            340                 345                 350

Glu Glu Asn Gln Asp Leu Tyr Met Val Ser Arg Glu Phe Phe Asp Leu
        355                 360                 365

Ile Gly Lys Ile Glu Asp Pro Trp Val Val Ala Gln Ala Tyr Gly Thr
    370                 375                 380

Phe Arg His Trp Gly His Pro Tyr Ile Asp Tyr Leu Asn Gly Leu Lys
385                 390                 395                 400

Asp Leu Glu Lys Arg Val Asn Glu Asn Ile Lys Ile Asp Lys Asn Tyr
                405                 410                 415

Ala Glu Lys Leu Ala Ser Asp Leu Ala Phe Ile Val Leu Lys Asp Gln
            420                 425                 430

Phe Gly Lys His Lys Arg Trp Phe Ala Lys Pro Asn Lys Glu Leu Asp
        435                 440                 445
```

```
Glu Asn Asn Pro Met Arg Lys Cys Ile Glu Asn Asn Val Trp Pro Asn
    450                 455                 460

Thr Lys Val Ile Leu Asp Phe Gly Asp Asn Trp His Lys Leu Glu Leu
465                 470                 475                 480

Leu Pro Cys Phe Glu Ile Pro Asp Ala Ile Asp Leu Ser Asp Leu Tyr
                485                 490                 495

Ser Asp Lys Ala His Ser Met Gln Tyr Ser Glu Val Leu Asn Tyr Val
            500                 505                 510

Lys Tyr Lys Lys Ser Lys Lys Asn Ile Pro Ala Leu Arg Val Ile Gly
        515                 520                 525

Thr Leu Leu Glu Lys Glu Asn Pro Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Lys
    530                 535                 540

Ile Asn Asp Glu Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys
545                 550                 555                 560

Ala Lys Glu Arg Glu Leu Lys Asp Lys Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met
                565                 570                 575

Ser Trp Asn Ile Arg Leu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys
            580                 585                 590

Leu His Phe Val Pro Leu Phe Ser Gly Leu Thr Val Ala Asp Asp Leu
        595                 600                 605

Asn Thr Val Thr Lys Lys Leu Leu Ser Ala Thr Glu Gly Gln Gly Leu
    610                 615                 620

Asp Asp Tyr Glu Arg Val Tyr Ile Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Glu Lys
625                 630                 635                 640

Trp Asn Asn Arg Gln Arg Tyr Glu Ser Asn Glu Pro Val Phe Thr Val
                645                 650                 655

Met Gly Lys Phe Leu Gly Tyr Pro Asn Leu Ile Ser Tyr Thr His Lys
            660                 665                 670

Ile Phe Glu Arg Ser Phe Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Leu Asp Leu Met
        675                 680                 685

Gly Val Asp Gly Tyr His Ile Tyr Asn Leu Phe Asp Asp Lys Met Val
    690                 695                 700
```

```
Cys Trp His Gly Gln Leu Gly Gly Phe Glu Gly Val Arg Gln Lys Gly
705                 710                 715                 720

Trp Ser Val Leu Asn Tyr Leu Ile Leu Arg Arg Glu Ala Ala Thr Arg
                725                 730                 735

Asn Thr Ala Pro Lys Phe Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Ile Val Ile
            740                 745                 750

Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ser Lys Ser Thr Gln Ala Ile Ile Glu Arg
        755                 760                 765

Glu Leu Arg Asn Ile Trp Glu Asn Asn Ala His Ile Met His Arg Ile
    770                 775                 780

Gln Gln Ala Thr Ser Arg Ile Gly Leu Val Ile Asn Asn Asp Glu Val
785                 790                 795                 800

Leu Thr Ser Ala Glu Leu Leu Val Tyr Gly Lys Ile Pro Val Phe Arg
                805                 810                 815

Gly Lys Leu Leu Pro Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Ser Thr
            820                 825                 830

Val Thr Asn Glu Gln Ile Pro Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ser
        835                 840                 845

Thr Thr Thr Ala Leu Ala Val Asn Gln His Ser Glu Asn Pro Ile Glu
    850                 855                 860

Val Ile Ser Gln His His Phe Phe Ser Ser Phe Ala Gly Thr Leu Val
865                 870                 875                 880

Thr Phe Val Asn Pro Ile Leu Gly Phe Asp Pro Ile Lys Tyr Ser Gln
                885                 890                 895

Leu Ser Glu Arg Asn Lys Lys Leu Phe Leu Leu Arg Leu Ile Tyr Lys
            900                 905                 910

Asp Pro Ser Val Gly Gly Val Cys Gly Thr Asn Leu Leu Arg Phe Phe
        915                 920                 925

Ile Ser Arg Phe Pro Asp Pro Leu Thr Glu Thr Leu Thr Trp Trp Lys
    930                 935                 940

Ile Leu Val Glu Asn Ser Lys Asp Lys Glu Val Val Lys Ile Ala Leu
```

945 950 955 960

Glu Cys Gly Asn Pro Lys Phe Gly Gly Ile Asn Asp Lys Thr Leu Ala
965 970 975

Met Leu Leu Glu Asp Pro Met Ser Leu Asn Ile Pro Gly Gly Leu Ser
980 985 990

Ser Asp Thr Met Ile Lys Asn Lys Ile Tyr Glu Gly Leu Ile His Gln
995 1000 1005

Met Gly Leu Lys Leu Ile Lys Asn Glu Leu Val Val Glu Ser Leu
1010 1015 1020

Thr Phe Tyr Asn Asp Tyr Lys Ala Gln Phe Val Arg Trp Leu Phe
1025 1030 1035

Ser Ile Arg Pro Ile Phe Pro Arg Phe Ile Ser Glu Phe Tyr Thr
1040 1045 1050

Ser Thr Tyr Phe Tyr Ile Thr Glu Ser Val Leu Ala Ile Phe Gln
1055 1060 1065

Asn Ser Arg Thr Ile Arg Lys Val Phe Ser Lys Arg Phe Pro Lys
1070 1075 1080

Glu Val Tyr Leu Thr Ile Val Lys Gly Glu Gln Met Ser Ile Asp
1085 1090 1095

Ser Leu Leu Thr Thr Lys Arg Gly Ile Val Arg Glu Ala Ile Trp
1100 1105 1110

Lys Cys Ser Ala Thr Lys Ala Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Trp
1115 1120 1125

Gly Arg Asp Met Val Gly Ile Thr Thr Pro His Pro Ala Glu Phe
1130 1135 1140

Thr Gln Glu Leu Leu Cys Ser Asp Gly Cys Ser Glu Pro His Ile
1145 1150 1155

Val Ala Lys Lys Val Ile Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Trp Thr Lys
1160 1165 1170

Gly Lys Met Met Pro Tyr Leu Gly Thr Lys Thr Lys Glu Ser Thr
1175 1180 1185

```
Ser Ile  Leu Gln Pro Trp Glu  Lys Arg Leu Glu Ile  Pro Leu Leu
    1190                1195                1200

Arg Lys  Ala Cys Asp Leu Arg  Lys Ala Ile Arg Trp  Phe Val Glu
    1205                1210                1215

Asp Asn  Ser Asn Leu Ala Lys  Ser Ile Tyr Lys Asn  Leu Glu Ser
    1220                1225                1230

Met Thr  Gly Ile Asp Leu Arg  Glu Glu Leu Arg Asn  Tyr Lys Arg
    1235                1240                1245

Thr Gly  Ser Ser Lys His Arg  Leu Arg Asn Ser Arg  Val Ser Asn
    1250                1255                1260

Glu Gly  Asn Pro Ala Ile Gly  Tyr Asn Asn Leu Thr  Tyr Val Thr
    1265                1270                1275

Val Thr  Thr Asp Ser Leu Gly  Asn Ile Asn Ser Glu  Asn Tyr Asp
    1280                1285                1290

Phe Met  Tyr Gln Ser Ile Leu  Cys Trp Cys Gly Val  Leu Ser Ser
    1295                1300                1305

Leu Ala  Thr Asn Arg Tyr Arg  Asp His Glu Thr Thr  His Phe His
    1310                1315                1320

Leu Lys  Cys Asn Asp Cys Phe  Arg Leu Val Lys Glu  Glu Ile Leu
    1325                1330                1335

Glu Ala  Pro Ser Val Tyr Pro  Phe Pro Asn Val Arg  Ser Ser Val
    1340                1345                1350

Arg Arg  Met Leu Thr Gln Asp  Ile Lys Leu Lys Tyr  Leu Pro Arg
    1355                1360                1365

Ile Ser  Ala Pro Asp Glu Asn  Thr Trp Asp Thr Leu  Asp Val Asp
    1370                1375                1380

Gln Lys  Ser Trp His Ile Gly  Arg Ala Gln Gly Phe  Leu Trp Gly
    1385                1390                1395

Leu Asn  Val Phe Thr Lys Thr  Thr Lys Glu Val Glu  Gly Asp Ile
    1400                1405                1410

Phe Pro  Thr Ser Ile Thr Lys  Lys Val Glu Pro Glu  Asn Tyr Met
    1415                1420                1425
```

```
Asp Gly  Leu His Arg Gly Phe  Cys Leu Gly Ala Thr  Leu Ser Pro
    1430                1435                1440

Met Tyr  Thr Arg Tyr Gly Ser  Leu Ser Arg Met Ala  Arg Arg Lys
    1445                1450                1455

Phe Glu  Gly Ala Tyr Trp Glu  Ile Val Asp Glu Ala  Met Lys Thr
    1460                1465                1470

Asn Leu  Pro Asn Met Ile Asp  His Lys Asn Phe Lys  Pro Phe Leu
    1475                1480                1485

Arg Arg  Thr Gly Gly Asp Leu  Ile Lys Ser Tyr Pro  Ala Arg Lys
    1490                1495                1500

Glu Glu  Leu Val Leu Val Leu  Lys Lys Trp Phe Leu  His Lys Met
    1505                1510                1515

Val Ser  Glu Arg Lys Asn Asn  Ser Ile Trp Glu Ser  Lys Arg Val
    1520                1525                1530

Ile Ala  Phe Ala Asp Met Asp  Thr Glu Phe Val Leu  Cys Leu Phe
    1535                1540                1545

Arg Leu  Ala Glu Ser Ile Leu  Asn Cys Tyr Gln Asn  Glu Ala Leu
    1550                1555                1560

Ser Ala  Gly Gln Ala Arg Val  Leu Gly Asn Ala Lys  Glu Thr Ile
    1565                1570                1575

Asp Leu  Ile Ser Lys Tyr Asn  Asn Ser Asn Ile Asn  Ala Asp Glu
    1580                1585                1590

Ile Glu  Arg Leu Gln Gln Ile  Leu Met Ala Ser Asp  Leu Lys Asp
    1595                1600                1605

His Glu  Val Val Asp Ser Gln  Ala Arg His Ala Ala  Ser Asp Leu
    1610                1615                1620

Pro Glu  Leu Ala Lys Ser Glu  Asn Tyr Asn Glu Val  Ile Lys Tyr
    1625                1630                1635

Val Glu  Phe Arg Gly Tyr Gly  Gly Lys Thr Ile Arg  Leu Glu Tyr
    1640                1645                1650

Gln Pro  Ser Asp Leu Ile Asp  Trp Lys Gly Gly Met  Val Gln Asp
    1655                1660                1665
```

```
Leu Gln  Val Pro Arg Leu Lys  Asn Pro Leu Ile Ser  Gly Val Arg
    1670                 1675                 1680

Val Val  Gln Tyr Ser Thr Gly  Ala His Tyr Lys Tyr  Lys Asp Ile
    1685                 1690                 1695

Glu Arg  Glu Phe Gln Ile Ala  Gly Asp Gly Ile Phe  Ala Gly Asp
    1700                 1705                 1710

Gly Ser  Gly Gly Met Gly Ala  Asn His Leu Arg Leu  His Lys Ser
    1715                 1720                 1725

Ala Arg  Val Ile Phe Asn Ser  Lys Leu Glu Leu Glu  Gly Glu Ser
    1730                 1735                 1740

Leu Lys  Gly Leu Ala Pro Ala  Gly Pro Gly Ala Tyr  Thr Val Ser
    1745                 1750                 1755

Gly Glu  Asp Val Val Glu Arg  Cys Val Asn Tyr Thr  Thr Cys Trp
    1760                 1765                 1770

Glu Glu  Ala Ser Asp Leu Ser  Asp Glu Lys Thr Trp  Lys Asn Phe
    1775                 1780                 1785

Phe Arg  Leu Ile Lys Glu Tyr  Ser Leu Asp Ile Glu  Val Phe Cys
    1790                 1795                 1800

Cys Asp  Ala Glu Val Gln Asp  Pro Tyr Ile Thr Asn  Lys Ile Glu
    1805                 1810                 1815

Ser Asn  Ile Leu Lys Tyr Ile  Ser Leu Ile Leu Asn  Lys Arg Thr
    1820                 1825                 1830

Gly Thr  Leu Ile Tyr Lys Thr  Tyr Phe Asn Arg Leu  Leu Asp Pro
    1835                 1840                 1845

Asn Thr  Ile Thr His Phe Leu  Gly Met Phe Phe His  Arg Cys Tyr
    1850                 1855                 1860

Gly Phe  Leu Pro Thr Thr Gln  Gly Ser Phe Thr Ser  Glu Ile Tyr
    1865                 1870                 1875

Ile Val  Cys Gln Tyr Pro Lys  Thr Leu Asp Ser Thr  Ser Lys Thr
    1880                 1885                 1890

Glu Leu  Thr Tyr Thr Ser Leu  Phe Asn Ile Tyr Gln  Asn Ile Arg
```

```
    1895                1900                1905

Val Met  Glu Thr Tyr Gln Asn  Glu Phe Asp Arg Ala  Cys Ser Leu
    1910                1915                1920

Leu Phe  Ser Asp Met Thr Glu  Gly Leu Ile Asp Lys  Thr Pro Phe
    1925                1930                1935

Leu Asp  Pro Glu Glu Leu Ala  Ile Phe Leu Thr Thr  Val Gly Leu
    1940                1945                1950

Asp Thr  Gly Trp Ala Leu Leu  Ile Ala Glu Gln Leu  Gln Ile Ser
    1955                1960                1965

Cys Ser  Asn Lys Leu His Pro  Ile Ile Ile Leu Trp  Ile Leu Gly
    1970                1975                1980

Phe Ile  Ile Ser Arg His Leu  Val Ser Ile Thr Ser  Trp Phe Arg
    1985                1990                1995

Arg Gly  Thr Lys Phe Pro Pro  Ser Ile Gln Leu Gln  Lys Met Leu
    2000                2005                2010

Ala Ala  Leu Phe Gly Ile Trp  Tyr Gly Val Ser Tyr  Ile Met Asn
    2015                2020                2025

Asp Ala  Glu Ser Tyr Ser Arg  Ile Ser Val Leu Tyr  Asn Gln Glu
    2030                2035                2040

Ile Tyr  Phe Ser Leu Gly Leu  Thr Asn Met Val Tyr  Arg Lys Lys
    2045                2050                2055

Asp Asp  Met Glu Leu Gly Gln  Phe Ser Thr Trp Lys  Ile Gly Pro
    2060                2065                2070

Gly Asp  Asn Ser Lys Leu Ile  Asp Ile Gly Pro Lys  Ala Gly Ile
    2075                2080                2085

Thr Gln  Thr Met Ile Arg Ala  Ile Val Val Leu Tyr  Lys Gly Glu
    2090                2095                2100

His Ile  Thr Ser Ile Val Thr  Lys Glu Asp Lys Val  Glu Gly Asp
    2105                2110                2115

Arg Ile  Leu Ser Leu Phe Gly  Lys Gly Leu Asn Leu  Lys Thr Leu
    2120                2125                2130
```

Met Glu Arg Thr Gly Ile Asn Tyr Leu Gln Ile Gly Glu Arg Asn
2135 2140 2145

Pro Gln Glu Ile Pro Tyr Thr Leu Glu Glu Glu Val Leu Glu Glu
2150 2155 2160

Val Val Glu Glu Asn Thr Gly Glu Phe Asp Gln Ser
2165 2170 2175

<210> 19
<211> 519
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> Isf-VSV quimérico

<400> 19

Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly
1 5 10 15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu
20 25 30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala
35 40 45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys
50 55 60

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His
65 70 75 80

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

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys
100 105 110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly
115 120 125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe
130 135 140

Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg
145 150 155 160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn

```
                165                 170                 175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu
            180                 185                 190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser
        195                 200                 205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu
    210                 215                 220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met
225                 230                 235                 240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile
                245                 250                 255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser
        275                 280                 285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr
    290                 295                 300

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

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg
            340                 345                 350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly
        355                 360                 365

Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp
    370                 375                 380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr
385                 390                 395                 400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val
                405                 410                 415
```

```
Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro
            420                 425                 430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe
        435                 440                 445

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

Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Thr Ile
465                 470                 475                 480

Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile Tyr Leu
                485                 490                 495

Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile
            500                 505                 510

Glu Met Asn Arg Leu Gly Thr
        515
```

<210> 20
<211> 1662
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> *Virus Maraba*

<400> 20

atgaaaaaaa ctaacagggt tcaaacactc ttgatcgagg tattgagact ttttctcttt 60

tgtttcttgg ccttaggagc ccactccaaa tttactatag tattccctca tcatcaaaaa 120

gggaattgga agaatgtgcc ttccacatat cattattgcc cttctagttc tgaccagaat 180

tggcataatg atttgactgg agttagtctt catgtgaaaa ttcccaaaag tcacaaagct 240

atacaagcag atggctggat gtgccacgct gctaaatggg tgactacttg tgacttcaga 300

tggtacggac ccaaatacat cacgcattcc atacactcta tgtcacccac cctagaacag 360

tgcaagacca gtattgagca gacaaagcaa ggagtttgga ttaatccagg ctttcccccct 420

caaagctgcg gatatgctac agtgacggat gcagaggtgg ttgttgtaca agcaacacct 480

catcatgtgt tggttgatga gtacacagga gaatggattg actcacaatt ggtgggggggc 540

aaatgttcca aggaggtttg tcaaacggtt cacaactcga ccgtgtggca tgctgattac 600

aagattacag ggctgtgcga gtcaaatctg gcatcagtgg atatcacctt cttctctgag 660

gatggtcaaa agacgtcttt gggaaaaccg aacactggat tcaggagtaa ttactttgct 720

tacgaaagtg gagagaaggc atgccgtatg cagtactgca cacaatgggg gatccgacta 780

ccttctggag tatggtttga attagtggac aaagatctct tccaggcggc aaaattgcct 840

gaatgtccta gaggatccag tatctcagct ccttctcaga cttctgtgga tgttagtttg 900

atacaagacg tagagaggat cttagattac tctctatgcc aggagacgtg gagtaagata 960

cgagccaagc ttcctgtatc tccagtagat ctgagttatc tcgccccaaa aaatccaggg 1020

agcggaccgg ccttcactat cattaatggc actttgaaat atttcgaaac aagatacatc 1080

agagttgaca taagtaatcc catcatccct cacatggtgg gaacaatgag tggaaccacg 1140

actgagcgtg aattgtggaa tgattggtat ccatatgaag acgtagagat tggtccaaat 1200

ggggtgttga aaactcccac tggtttcaag tttccgctgt acatgattgg gcacggaatg 1260

ttggattccg atctccacaa atcctcccag gctcaagtct tcgaacatcc acacgcaaag 1320

gacgctgcat cacagcttcc tgatgatgag actttatttt ttggtgacac aggactatca 1380

aaaaacccag tagagttagt agaaggctgg ttcagtagct ggaagagcac attggcatcg 1440

ttctttctga ttataggctt gggggttgca ttaatcttca tcattcgaat tattgttgcg 1500

attcgatcac gaattctgga tccgatacgt aacgctctgc agctgcgggt tgcattaatc 1560

ttcatcattc gaattattgt tgcgattcgc tataaataca aggggaggaa gacccaaaaa 1620

atttacaatg atgtcgagat gagtcgattg ggaaataaat aa 1662

<210> 21
<211> 518
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Muir Springs*

<220>
<221> misc_feature
<222> (384)..(384)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (386)..(386)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (389)..(390)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 21

```
Met Lys Tyr Pro Val Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Gln Ile Leu Leu Lys
1               5                  10                  15

Trp Asn Thr Cys Leu Leu Met Ser Trp Asn Ser Gln Lys His His Glu
            20                  25                  30
```

```
Leu Ala Pro Val Gln Gly Tyr Leu Cys Ser Gly Leu Arg Tyr Lys Val
        35                  40                  45

Ile Cys Ser Glu Gly Phe Phe Gly Gln Lys Thr Ile Thr Lys Lys Ile
    50                  55                  60

Glu Asn Leu Glu Pro Asp Gln Asn Lys Cys Val Gln Asp Leu Glu Lys
65                  70                  75                  80

Phe Ile Asn Asp Asp Tyr Leu Leu Pro Tyr Phe Pro Ser Glu Asp Cys
                85                  90                  95

Asn Trp Met Lys Glu Thr Pro Val His Gln Asp Phe Ile Val Tyr Gln
            100                 105                 110

Lys His Gln Val Lys Tyr Asp Pro Tyr His Asn Gly Phe Tyr Asp Ala
        115                 120                 125

Leu Phe Lys Lys Asp Phe Cys Gln Glu Lys Ile Cys Glu Thr Glu His
    130                 135                 140

Asp Gln Thr Ile Trp Ile Thr Asn Gln Glu Leu Lys Gln Glu Cys Thr
145                 150                 155                 160

Phe Asn Tyr Pro Val Lys Lys His Val Phe Tyr Lys Arg Asp Tyr Ser
                165                 170                 175

Lys Met Ile Ile Asp Tyr Glu Ile Asn Gln Trp Thr Ser Val Glu Asp
            180                 185                 190

Gly Cys Leu Ile Arg Tyr Cys Gly Gln Glu Gly Ile Arg Leu Ser Asn
        195                 200                 205

Gly Met Phe Phe Val Gly Lys Phe Tyr Lys Leu Ile Ser Asn Leu Pro
    210                 215                 220

Ile Cys Pro Glu Gly Thr Lys Ile Ser Tyr Lys Pro Ile Lys Ala Gln
225                 230                 235                 240

Leu Asp Glu Ile Glu Asn Glu Ile Ile Leu Asn Gln Glu Arg Leu Leu
                245                 250                 255

Cys Leu Asp Ser Ile Arg Gln Met Thr Ala Ser Lys Lys Leu Ser Phe
            260                 265                 270

Tyr Ser Leu Ser Phe Leu Glu Pro Lys Ser Met Ser Arg His Lys Val
```

```
        275                 280                 285

Tyr Arg Ile His Asn Asn Thr Leu Glu Tyr Thr Glu Thr Glu Trp Glu
    290                 295                 300

Pro Ile Val Ala Phe Asn Phe Asn Gly Lys Asn Gln Ile Gly Val Asn
305                 310                 315                 320

Lys Glu Gly Lys Glu Val Tyr Trp Asn Glu Trp Val Pro Ser Gly Lys
                325                 330                 335

Asp Gly Leu Leu Ser Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Lys Val Asn Ser
            340                 345                 350

Ser Lys Ile Ser Ile Ser Arg Leu Glu Thr Ile Lys Glu Asp Tyr Glu
        355                 360                 365

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

Ile Xaa His Leu Xaa Xaa Glu Asn Ile Thr Gly Ser Arg Val Glu Ile
385                 390                 395                 400

Val Asn Thr Glu His Ser Asp Val Ser Gly Trp Phe Ser Ser Val Leu
                405                 410                 415

Lys Ser Phe Trp Gly Lys Leu Met Met Thr Val Val Ser Ile Ile Ile
            420                 425                 430

Ile Ile Ile Ile Gly Leu Leu Ile Ile Asn Cys Gly Pro Ile Ile Cys
        435                 440                 445

Lys Thr Cys Ile Ser Ser Tyr Lys Lys Lys Lys Ser Arg Arg Asp Arg
    450                 455                 460

Phe Arg Ala Asp Arg Glu Thr Glu Thr Gly Leu Arg Arg Gln His Arg
465                 470                 475                 480

Val Val Phe His Asn Asn Glu Thr Asp Asp Glu Arg Ala Ile Glu Met
                485                 490                 495

Thr Gly His His Phe Gly Lys His Val Arg Ser Glu Leu Arg Pro Arg
            500                 505                 510

Arg His Pro Gly Ser Gly
        515
```

<210> 22
<211> 2248
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> *Virus Muir Springs*

<400> 22

gcggcggggg ctggccatca ctttggcaag cacgtgagat ctgattcgcg gccgcgtcga 60

cgcccctgaa actcctgatc ctatcctcct ccaaggagat aaaacttatc tctttttagt 120

cccttcagag agcaaaaatt ggaaacccgc agatcttaat gaagtatcct gtcctcctct 180

tatatcaaaa ccagatactg ctgaaatgga atacatgtct actgatgtca tggaactcgc 240

aaaaacatca tgaactcgcg cctgtgcaag ggtatttatg ttctggctta agatataaag 300

ttatttgttc tgaaggattc tttggacaaa aaacaataac taagaaaatt gaaaatcttg 360

aacctgatca gaacaaatgt gttcaagatt tagaaaagtt tattaatgac gattatttgc 420

taccctattt cccatcagaa gattgtaatt ggatgaaaga aacaccagtt catcaagatt 480

tcatagttta ccaaaaacat caggttaaat atgatccata ccacaatggc ttttacgatg 540

ctctgttcaa gaaagatttt tgtcaagaga aaatatgtga gacagagcat gatcagacaa 600

tatggataac taaccaagaa ttaaaacaag aatgcacttt taattatccg gttaaaaaac 660

atgtattcta taagagagat tatagcaaaa tgatcatcga ttatgaaatc aaccaatgga 720

cttcagttga ggatggatgt ttgataagat attgtggtca ggaaggaatt agattatcta 780

atgggatgtt ctttgtagga aaattttaca aattaatatc gaatctgcca atttgtccag 840

aaggaaccaa gatcagctac aagcccatta aagcacaatt agatgaaata gaaaatgaaa 900

taattttaaa tcaagaaaga cttttatgtt tagattctat acgacaaatg actgcttcta 960

aaaaattatc tttttattca ttatccttct tggagcctaa atccatgagt agacataagg 1020

tctatagaat tcacaataat actttagaat acactgaaac tgaatgggaa cctatagtgg 1080

cttttaattt taatggaaag aatcaaatcg gagtaaataa agaagggaag gaagtttatt 1140

ggaatgaatg ggtgcccagt ggaaaagatg gattgctctc aggattcaat ggagtttata 1200

agaaagttaa ttcttccaaa atttcaatat caagattaga aaccattaaa gaagattatg 1260

aaagagaaat gatgatagat catgaattgg ttacagttga gcatcctama attgkccatc 1320

ttaawasaga aaacatmaca ggttctagag tggagatagt taatactgaa cattcagacg 1380

tcagtggttg gttctcatct gttttaaaga gtttttgggg aaagttgatg atgactgttg 1440

tcagtataat aataattatc atcataggcc tattgattat caattgtggt ccaattatct 1500

gtaaaacttg cattagcagc tataaaaaga aaaagagtag aagagataga tttagagcag 1560

atagagaaac tgaaactgga ctgcgtcgac aacatagagt ggtatttcat aataatgaaa 1620

cagatgatga aagagcaata gagatgactg gccatcactt tggcaagcac gtgagatctg 1680

aattgcggcc gcgtcgacat cctggctcag gatgaacgct ggctgtgtgc ctaatacatg 1740

catgtcgagc gaggttcttt tgaacctagc ggcgaatggg tgagtaacac gtgcttaatc 1800

taccctttag attggaatac ccaatggaaa cattggctaa tgccggatac gcatggaatc 1860

gcatgattcc gttgtgaaag gagcctttaa agctccgcta gaggatgagg gtgcggaaca 1920

ttagttagtt ggtagggtaa tggcctacca agactatgat gtttagccgg gtcgagagac 1980

tgaacggcca cattgggact gagatacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga 2040

atattccaca atgagcgaaa gcttgatgga gcgacacagc gtgcacgatg aaggtcttcg 2100

gattgtaaag tgctgttata gggaaagaac acctggttga ggaaatgctt ccaggctgac 2160

ggtaccctgt cagaaagcga tggctaacta tgtgccagca gccgcggtaa tacataggtc 2220

gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgt 2248

<210> 23
<211> 1948
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223>VSV

<400> 23
acgcgttttc gccaccatgc cgaagcgccg cgctggattc cggaaaggct ggtacgcgcg 60

gcagaggaac tccctgacgc atcaaatgca acgcatgacg ctgagcgagc ccacgagtga 120

gctgcccacc cagaggcaaa ttgaagcgct aatgcgctac gcctggaatg aggcacatgt 180

acaacctccg gtgacaccta ctaacatctt gatcatgtta ttattattgt tacagcgggt 240

acaaaatggg gcagctgcgg ctttttgggc gtacattcct gatccgccaa tgattcaatc 300

cttaggatgg gatagagaaa tagtacccgt atatgttaat gatacgagcc ttttaggagg 360

aaaatcagat attcacattt cccctcagca agcaaatatc tctttttatg gccttaccac 420

tcaatatccc atgtgctttt cttatcaatc gcagcatcct cattgtatac aggtatcagc 480

tgacatatca tatcctcgag tgactatctc aggcattgat gaaaaaactg ggaaaaaatc 540

atacgggaac ggatctggac ccctcgacat tccgttttgt gacaagcatt taagcattgg 600

cataggcata gacactcctt ggactttatg tcgagcccgg gtcgcgtcag tatataacat 660

caataatgcc aatgccacct ttttatggga ttgggcacct ggaggaacac ctgatttcc 720

tgaatatcga ggacagcatc cgcctatttt ctctgtgaat accgctccaa tataccaaac 780

ggaactatgg aaacttttgg ctgcttttgg tcatggcaat agtttatatt tacagcccaa 840

tatcagtgga agcaaatatg gtgatgtagg agttacagga tttttatatc ctcgagcttg 900

cgtgccgtat ccattcatgt tgatacaagg ccatatggaa ataacactgt cattaaatat 960

ttatcatttg aattgttcta attgcatact gactaattgt atcaggggag tagccaaagg 1020

agaacaggtt ataatagtaa aacagcctgc ctttgtaatg ctgcccgttg aaatagctga 1080

agcctggtat gatgaaactg ctttagaatt attacaacgc attaatacgg ctcttagccg 1140

ccctaagaga ggcctgagcc tgattattct gggtatagta tctttaatca ccctcatagc 1200

tacagctgtt acggcttccg tatctttagc acagtctatt caagctgcgc acacggtaga 1260

ctccttatca tataatgtta ctaaagtgat ggggacccaa gaagatattg ataaaaaaat 1320

agaagatagg ctatcagctc tatatgatgt agtcagagtc ttaggagagc aagttcagag 1380

cattaatttt cgcatgaaaa tccaatgtca tgctaactat aaatggattt gtgttacaaa 1440

aaaaccatac aacacttctg attttccatg ggacaaagtg aagaaacatt tgcaaggaat 1500

ttggttcaat actaatctat cgttagacct tttacaactg cataatgaga ttcttgatat 1560

tgaaaattcg ccgaaggcta cactaaatat agccgatact gttgataatt tcttgcaaaa 1620

tttattctct aatttcccta gtctccattc gctgtggaaa accctgattg gtgtaggaat 1680

acttgtgttt attataattg tcgtaatcct tatatttcct tgcctcgtac gtagtagttg 1740

gaagagctct attgcctctt ttttctttac catagggtta atcattggac tattcttggt 1800

tctccgagtt ggtatttatc tttgcattaa attaaagcac accaagaaaa gacagattta 1860

tacagacata gagatgaacc gacttggaac gtaactcaaa tcctcgaggc taggtatgaa 1920

aaaaactaac agatatcacg gctagcgg 1948

<210> 24
<211> 2031
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> *Virus Ébola*

<400> 24
atgggcgtta caggaatatt gcagttacct cgtgatcgat tcaagaggac atcattcttt 60

ctttgggtaa ttatcctttt ccaaagaaca ttttccatcc cacttggagt catccacaat 120

agcacattac aggttagtga tgtcgacaaa ctagtttgtc gtgacaaact gtcatccaca 180

aatcaattga gatcagttgg actgaatctc gaagggaatg gagtggcaac tgacgtgcca 240

tctgcaacta aaagatgggg cttcaggtcc ggtgtcccac caaaggtggt caattatgaa 300

gctggtgaat gggctgaaaa ctgctacaat cttgaaatca aaaaacctga cgggagtgag 360

tgtctaccag cagcgccaga cgggattcgg ggcttccccc ggtgccggta tgtgcacaaa 420

gtatcaggaa cgggaccgtg tgccggagac tttgccttcc ataaagaggg tgctttcttc 480

ctgtatgatc gacttgcttc cacagttatc taccgaggaa cgactttcgc tgaaggtgtc 540

gttgcatttc tgatactgcc ccaagctaag aaggacttct tcagctcaca ccccttgaga 600

gagccggtca atgcaacgga ggacccgtct agtggctact attctaccac aattagatat 660

caggctaccg gttttggaac caatgagaca gagtacttgt tcgaggttga caatttgacc 720

tacgtccaac ttgaatcaag attcacacca cagtttctgc tccagctgaa tgagacaata 780

tatacaagtg ggaaaaggag caataccacg ggaaaactaa tttggaaggt caaccccgaa 840

attgatacaa caatcgggga gtgggccttc tgggaaacta aaaaaaacct cactagaaaa 900

attcgcagtg aagagttgtc tttcacagtt gtatcaaacg gagccaaaaa catcagtggt 960

cagagtccgg cgcgaacttc ttccgaccca gggaccaaca caacaactga agaccacaaa 1020

atcatggctt cagaaaattc ctctgcaatg gttcaagtgc acagtcaagg aagggaagct 1080

gcagtgtcgc atctaacaac ccttgccaca atctccacga gtccccaatc cctcacaacc 1140

aaaccaggtc cggacaacag cacccataat acacccgtgt ataaacttga catctctgag 1200

gcaactcaag ttgaacaaca tcaccgcaga acagacaacg acagcacagc ctccgacact 1260

ccctctgcca cgaccgcagc cggaccccca aaagcagaga acaccaacac gagcaagagc 1320

actgacttcc tggaccccgc caccacaaca agtccccaaa accacagcga gaccgctggc 1380

aacaacaaca ctcatcacca agataccgga gaagagagtg ccagcagcgg gaagctaggc 1440

ttaattacca atactattgc tggagtcgca ggactgatca caggcgggag aagaactcga 1500

agagaagcaa ttgtcaatgc tcaacccaaa tgcaacccta atttacatta ctggactact 1560

caggatgaag gtgctgcaat cggactggcc tggataccat atttcgggcc agcagccgag 1620

ggaatttaca tagaggggct aatgcacaat caagatggtt taatctgtgg gttgagacag 1680

ctggccaacg agacgactca agctcttcaa ctgttcctga gagccacaac tgagctacgc 1740

acctttttcaa tcctcaaccg taaggcaatt gatttcttgc tgcagcgatg gggcggcaca 1800

tgccacattc tgggaccgga ctgctgtatc gaaccacatg attggaccaa gaacataaca 1860

gacaaaattg atcagattat tcatgatttt gttgataaaa cccttccgga ccaggggggac 1920

aatgacaatt ggtggacagg atggagacaa tggataccgg caggtattgg agttacaggc 1980

gttataattg cagttatcgc tttattctgt atatgcaaat ttgtctttta g 2031

<210> 25
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 25
ctcgagggta tgaaaaaaac taacagatat cacggctag 39

<210> 26
<211> 523

<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus isfahan*

<400> 26

```
Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly
1               5                  10                  15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu
            20                  25                  30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala
        35                  40                  45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys
    50                  55                  60

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His
65                  70                  75                  80

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

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys
            100                 105                 110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly
        115                 120                 125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe
    130                 135                 140

Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg
145                 150                 155                 160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn
                165                 170                 175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu
            180                 185                 190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser
        195                 200                 205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu
```

```
    210                 215                 220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met
225                 230                 235                 240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile
                245                 250                 255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser
        275                 280                 285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr
    290                 295                 300

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

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg
            340                 345                 350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly
        355                 360                 365

Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp
    370                 375                 380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr
385                 390                 395                 400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val
                405                 410                 415

Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro
            420                 425                 430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe
        435                 440                 445

Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly
    450                 455                 460
```

```
Trp Phe Ser Asp Trp Lys Glu Thr Ala Ala Ala Leu Gly Phe Ala Ala
465                 470                 475                 480

Ile Ser Val Ile Leu Ile Ile Gly Leu Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu
                485                 490                 495

Cys Arg Arg Arg Lys Gln Lys Lys Val Ile Tyr Lys Asp Val Glu Leu
            500                 505                 510

Asn Ser Phe Asp Pro Arg Gln Ala Phe His Arg
        515                 520
```

<210> 27
<211> 530
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *Virus Chandipura*

<400> 27

```
Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile
1               5                  10                  15

Thr Pro Ser Tyr Ser Ser Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys
            20                  25                  30

Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly
        35                  40                  45

Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys
65                  70                  75                  80

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

Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp
            100                 105                 110

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

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

Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr
```

```
145                 150                 155                 160

Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln
                165                 170                 175

Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp
            180                 185                 190

Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val
        195                 200                 205

Thr Val Ala Tyr Val Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Ala Ile Val
    210                 215                 220

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

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

Val Ser Leu Asp Val Lys Thr Lys Ile Gln Glu Lys Pro Leu Leu Pro
            260                 265                 270

Leu Phe Lys Glu Cys Pro Ala Gly Thr Glu Val Arg Ser Thr Leu Gln
        275                 280                 285

Ser Asp Gly Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp
    290                 295                 300

Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro
305                 310                 315                 320

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

Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr
            340                 345                 350

Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Met Lys
        355                 360                 365

Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln
    370                 375                 380

Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys
385                 390                 395                 400
```

Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile
405 410 415

Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His
420 425 430

Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile
435 440 445

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

Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Glu Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu
465 470 475 480

Ile Leu Val Val Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Arg Cys Phe Pro Val
485 490 495

Leu Cys Thr Thr Cys Arg Lys Pro Lys Trp Lys Lys Gly Val Glu Arg
500 505 510

Ser Asp Ser Phe Glu Met Arg Ile Phe Lys Pro Asn Asn Met Arg Ala
515 520 525

Arg Val
530

<210> 28
<211> 611
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> *retrovirus Jaagsietke de oveja*

<400> 28

Met Pro Lys Arg Arg Ala Gly Phe Arg Lys Gly Trp Tyr Ala Arg Gln
1 5 10 15

Arg Asn Ser Leu Thr His Gln Met Gln Arg Met Thr Leu Ser Glu Pro
20 25 30

Thr Ser Glu Leu Pro Thr Gln Arg Gln Ile Glu Ala Leu Met Arg Tyr
35 40 45

Ala Trp Asn Glu Ala His Val Gln Pro Pro Val Thr Pro Thr Asn Ile
50 55 60

Leu Ile Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Arg Ile Gln Asn Gly Ala Ala

65 70 75 80

Ala Thr Phe Trp Ala Tyr Ile Pro Asp Pro Pro Met Leu Gln Ser Leu
85 90 95

Gly Trp Asp Lys Glu Thr Val Pro Val Tyr Val Asn Asp Thr Ser Leu
100 105 110

Leu Gly Gly Lys Ser Asp Ile His Ile Ser Pro Gln Gln Ala Asn Ile
115 120 125

Ser Phe Tyr Gly Leu Thr Thr Gln Tyr Pro Met Cys Phe Ser Tyr Gln
130 135 140

Ser Gln His Pro His Cys Ile Gln Val Ser Ala Asp Ile Ser Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Ser Gly Ile Asp Glu Lys Thr Gly Met Arg Ser Tyr
165 170 175

Arg Asp Gly Thr Gly Pro Leu Asp Ile Pro Phe Cys Asp Lys His Leu
180 185 190

Ser Ile Gly Ile Gly Ile Asp Thr Pro Trp Thr Leu Cys Arg Ala Arg
195 200 205

Ile Ala Ser Val Tyr Asn Ile Asn Asn Ala Asn Thr Thr Leu Leu Trp
210 215 220

Asp Trp Ala Pro Gly Gly Thr Pro Asp Phe Pro Glu Tyr Arg Gly Gln
225 230 235 240

His Pro Pro Ile Ser Ser Val Asn Thr Ala Pro Ile Tyr Gln Thr Glu
245 250 255

Leu Trp Lys Leu Leu Ala Ala Phe Gly His Gly Asn Ser Leu Tyr Leu
260 265 270

Gln Pro Asn Ile Ser Gly Ser Lys Tyr Gly Asp Val Gly Val Thr Gly
275 280 285

Phe Leu Tyr Pro Arg Ala Cys Val Pro Tyr Pro Phe Met Val Ile Gln
290 295 300

Gly His Met Glu Ile Thr Pro Ser Leu Asn Ile Tyr Tyr Leu Asn Cys
305 310 315 320

```
Ser Asn Cys Ile Leu Thr Asn Cys Ile Arg Gly Val Ala Lys Gly Glu
                325                 330                 335

Gln Val Ile Ile Val Lys Gln Pro Ala Phe Val Met Leu Pro Val Glu
            340                 345                 350

Ile Thr Glu Glu Trp Tyr Asp Glu Thr Ala Leu Glu Leu Leu Gln Arg
        355                 360                 365

Ile Asn Thr Ala Leu Ser Arg Pro Lys Arg Gly Leu Ser Leu Ile Ile
    370                 375                 380

Leu Gly Ile Val Ser Leu Ile Thr Leu Ile Ala Thr Ala Val Thr Ala
385                 390                 395                 400

Ser Val Ser Leu Ala Gln Ser Ile Gln Val Ala His Thr Val Asp Ser
                405                 410                 415

Leu Ser Ser Asn Val Thr Lys Val Met Gly Thr Gln Glu Asn Ile Asp
            420                 425                 430

Lys Lys Ile Glu Asp Arg Leu Pro Ala Leu Tyr Asp Val Val Arg Val
        435                 440                 445

Leu Gly Glu Gln Val Gln Ser Ile Asn Phe Arg Met Lys Ile Gln Cys
    450                 455                 460

His Ala Asn Tyr Lys Trp Ile Cys Val Thr Lys Lys Pro Tyr Asn Thr
465                 470                 475                 480

Ser Asp Phe Pro Trp Asp Lys Val Lys Lys His Leu Gln Gly Ile Trp
                485                 490                 495

Phe Asn Thr Thr Val Ser Leu Asp Leu Leu Gln Leu His Asn Glu Ile
            500                 505                 510

Leu Asp Ile Glu Asn Ser Pro Lys Ala Thr Leu Asn Ile Ala Asp Thr
        515                 520                 525

Val Asp Asn Phe Leu Gln Asn Leu Phe Ser Asn Phe Pro Ser Leu His
    530                 535                 540

Ser Leu Trp Arg Ser Ile Ile Ala Met Gly Ala Val Leu Thr Phe Val
545                 550                 555                 560

Leu Ile Ile Ile Cys Leu Ala Pro Cys Leu Ile Arg Ser Ile Val Lys
                565                 570                 575
```

```
Glu Phe Leu His Met Arg Val Leu Ile His Lys Asn Met Leu Gln His
            580                 585                 590

Gln His Leu Met Glu Leu Leu Asn Asn Lys Glu Arg Gly Ala Ala Gly
        595                 600                 605

Asp Asp Pro
    610
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un rhabdovirus oncolítico Farmington para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano mediante cirugía o terapia.

2. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un rhabdovirus oncolítico Farmington para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto en el que la composición se va a administrar al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el cáncer es metastático.

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición se administra mediante administración intraperitoneal, intravascular, intramuscular, intratumoral, subcutánea o intranasal, en particular en la que la composición se administra mediante administración intratumoral o intravascular.

5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición se administra múltiples veces.

6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente la administración de una terapia anticáncer adicional.

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la terapia anticáncer adicional es quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia.

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la terapia anticáncer adicional comprende la administración al sujeto de un segundo virus oncolítico.

9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el segundo virus oncolítico es un virus vaccinia, herpesvirus, adenovirus, alfavirus, parvovirus o rhabdovirus.

10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el segundo virus oncolítico es un virus vaccinia.

11. Un rhabdovirus oncolítico Farmington para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto en el que el rhabdovirus oncolítico Farmington es para administrar al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

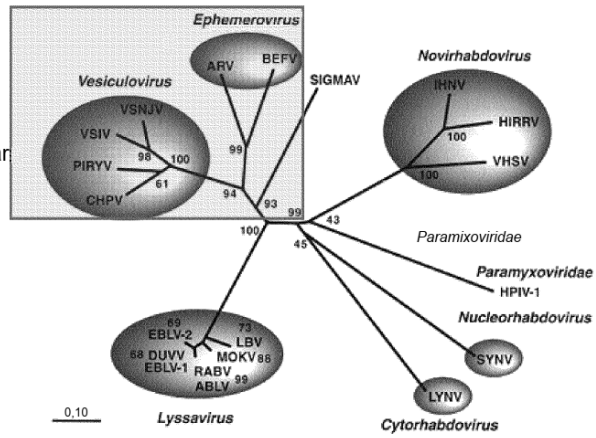
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el rhabdovirus Farmington para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central, cáncer pancreático, cáncer prostático, cáncer renal, cáncer de huesos, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer gastrointestinal, linfoma, cáncer de colon, melanoma, y cáncer de vejiga, en particular en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, sistema nervioso central, melanoma, pulmón, ovárico, pancreático, de colon, de próstata y renal.

13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el rhabdovirus Farmington para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el sujeto es un ser humano.

14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el rhabdovirus Farmington para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el cáncer es un cáncer del sistema nervioso central.

Dimarhabdovirus

Más muchos virus sin asignar



Una gran familia
> 150 miembros

Extremadamente diversa:
Infecta levaduras,
Invertebrados
Vertebrados y
Plantas

FIG. 1

Citotoxicidad
Panel NCI60
96h

Organismo	Fuente	Línea celular	Día	MS	BG	NGG	TIB	FMT	MRB	CRJ	VSVHR	VV
Humano	Hueso, Osteosarcoma	U2OS	Día 4	3	3	3	4	1	1	1	2	2
Humano	Mama	MCF7 (2do)	Día 4	5	5	7	5	2	2	1	2	2
Humano	Mama	MDA-MB-231	Día 4	4	4	7	4	2	1	1	1	2
Humano	Mama	MDA-MB-435	Día 4	5	5	7	5	2	2	1	2	3
Humano	Mama	NCI/ADR-RES	Día 4	7	5	7	5	3	2	4	2	2
Humano	Mama	T47D	Día 4	5	5	5	5	2	2	2	3	2
Humano	SNC	SF268	Día 4	4	4	7	5	1	2	1	2	3
Humano	SNC	SF295	Día 4	7	5	4	5	3	2	2	2	3
Humano	SNC	SF539	Día 4	5	5	7	5	1	1	1	1	2
Humano	SNC	SNB19	Día 4	2	1	7	4	1	1	1	1	3
Humano	SNC	SNB75	Día 4	X	5	X	5	1	2	5	1	1
Humano	SNC	U118	Día 4	5	5	7	4	1	2	1	2	1
Humano	SNC	U343	Día 4	4	3	7	4	1	1	1	1	2
Humano	SNC	U373	Día 4	2	1	7	3	1	1	1	1	2
Humano	Colon	COLO 205	Día 4	X	7	X	7	7	3	3	3	3
Humano	Colon	HCT116	Día 4	5	5	7	5	1	2	1	2	2
Humano	Colon	HCT15	Día 4	7	7	7	7	7	2	3	3	3
Humano	Colon	HT29	Día 4	X	5	X	5	5	2	1	2	3
Humano	Colon	SW620	Día 4	X	3	X	5	2	2	1	1	4
Humano	Melanoma	M14	Día 4	5	7	5	5	3	3	1	3	1
Humano	Melanoma	MALME3M	Día 4	5	5	4	5	2	3	5	3	1
Humano	Melanoma	SKMEL28	Día 4	4	4	7	5	1	3	1	2	1
Humano	Melanoma	UACC257	Día 4	5	5	7	5	2	2	1	2	1
Humano	Melanoma	UACC62	Día 4	5	5	7	7	2	3	4	2	1
Humano	Pulmón	A549	Día 4	5	5	X	5	1	2	3	1	3
Humano	Pulmón	HOP62	Día 4	7	5	7	5	1	2	3	2	1
Humano	Pulmón	HOP92	Día 4	7	5	7	7	2	3	3	3	2
Humano	Pulmón	NCI-H226	Día 4	5	5	7	5	3	2	4	4	3
Humano	Pulmón	NCI-H23	Día 4	X	5	X	5	3	2	1	1	2
Humano	Ovárico	OVCAR3	Día 4	5	5	5	5	3	3	2	2	2
Humano	Ovárico	OVCAR4	Día 4	X	5	X	5	5	2	3	1	3
Humano	Ovárico	OVCAR8	Día 4	X	2	X	3	1	1	1	1	1
Humano	Páncreas	PANC-1	Día 4	2	1	5	4	1	1	1	1	1
Humano	Próstata	DU145	Día 4	5	7	7	5	5	3	5	3	2
Humano	Próstata	PC3	Día 4	7	7	7	7	3	2	5	3	2
Humano	Renal	786-O	Día 4	5	5	X	5	4	1	5	1	3
Humano	Renal	ACHN	Día 4	5	4	7	5	1	2	1	1	3
Humano	Renal	SN12C	Día 4	5	5	5	7	2	3	4	2	2
Humano	Renal	TK10	Día 4	7	5	7	5	1	2	1	1	2
Humano	Carcinoma de piel	A431	Día 4	7	5	X	5	4	3	5	4	2
Mono	Riñón, Normal	CV-1	Día 4	4	3	X	5	1	1	1	1	2
Mono	Riñón, Normal	VERO	Día 4	7	4	7	4	1	1	1	1	3
Mono	Mama	EMT6	Día 4	4	5	7	4	3	1	5	1	4
Mono	Mama	4T1	Día 4	3	4	1	4	2	2	3	2	3
Mono	Colon	CT26	Día 4	4	4	5	3	5	1	1	1	4
Mono	Glioma	GL261	Día 4	X	5	X	5	5	2	5	2	2

Las cepas estrechamente relacionadas se comportan de manera diferente en las mismas células

Los mismos virus se comportan de manera diferente en las mismas células

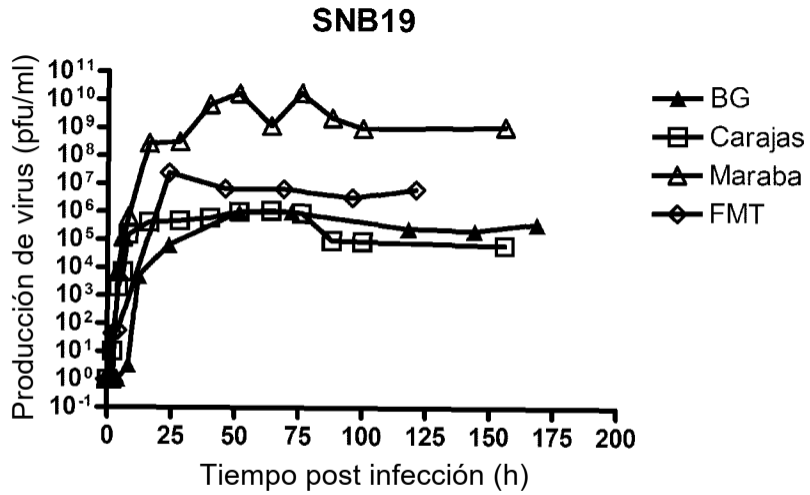
Leyenda

EC_{50}

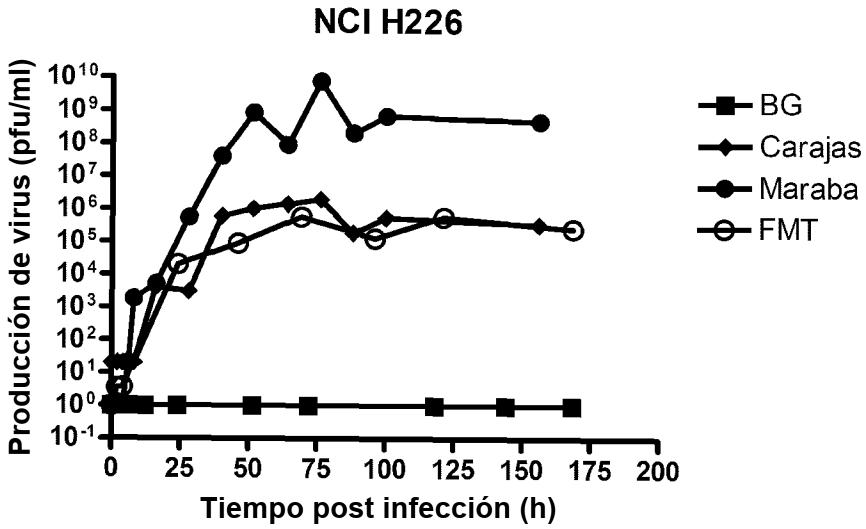
1 = <0,001
2 = <0,01
3 = <0,1
4 = <1
5 = <10
6 = >10
7 = >>10

FIG. 2

A


SNB19
Producción de virus (pfu/ml)
Tiempo post infección (h)
BG
Carajas
Maraba
FMT

B


NCI H226
Producción de virus (pfu/ml)
Tiempo post infección (h)
BG
Carajas
Maraba
FMT

FIGs. 3A-3B

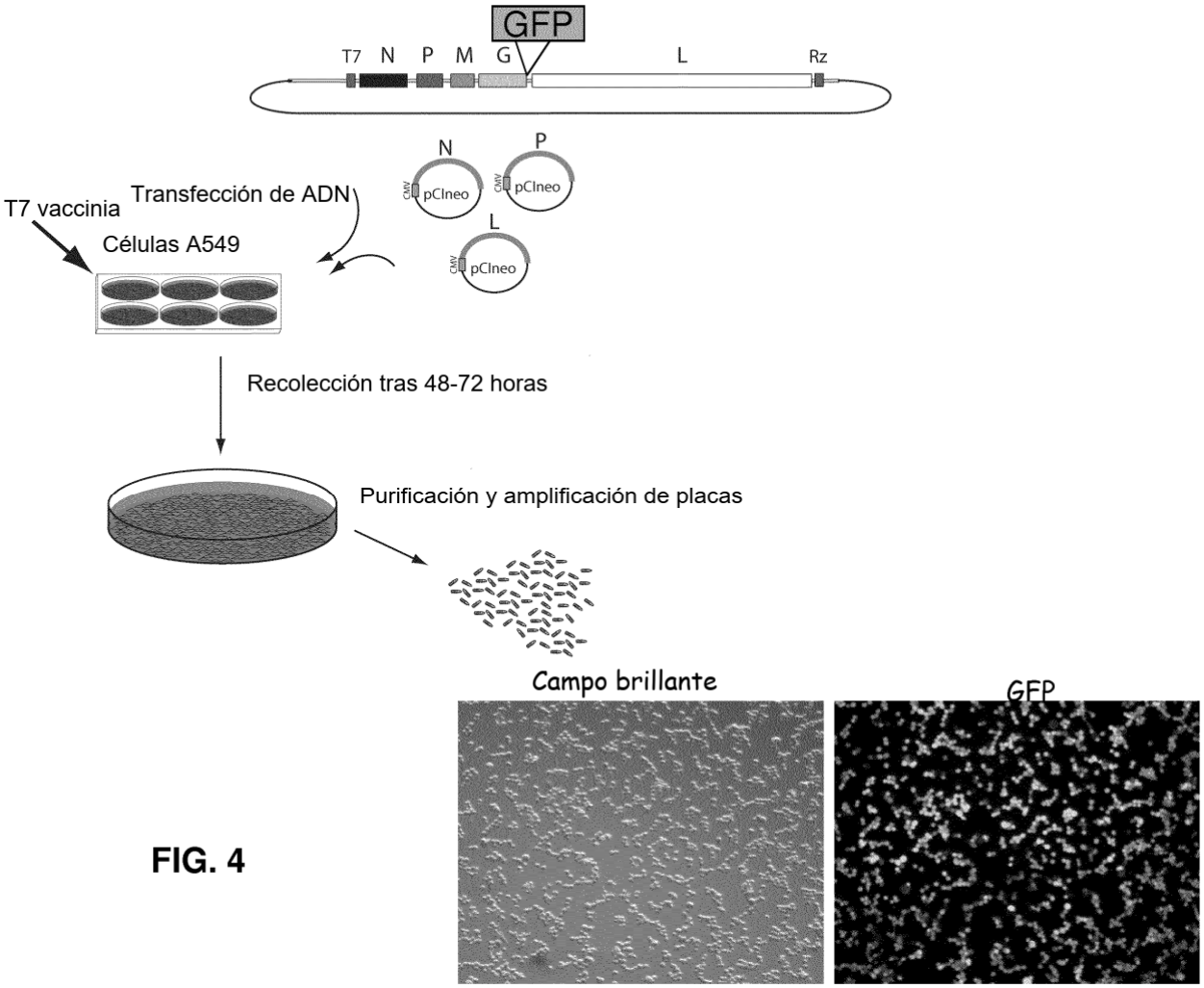

GFP
T7
N
P
M
G
L
Rz
N
P
L
pCIneo
T7 vaccinia
Transfección de ADN
Células A549
Recolección tras 48-72 horas
Purificación y amplificación de placas
Campo brillante
GFP

FIG. 4

Evolución dirigida de Bahía Grande

Objetivo: Selección de variantes con replicación más rápida en GBM humano

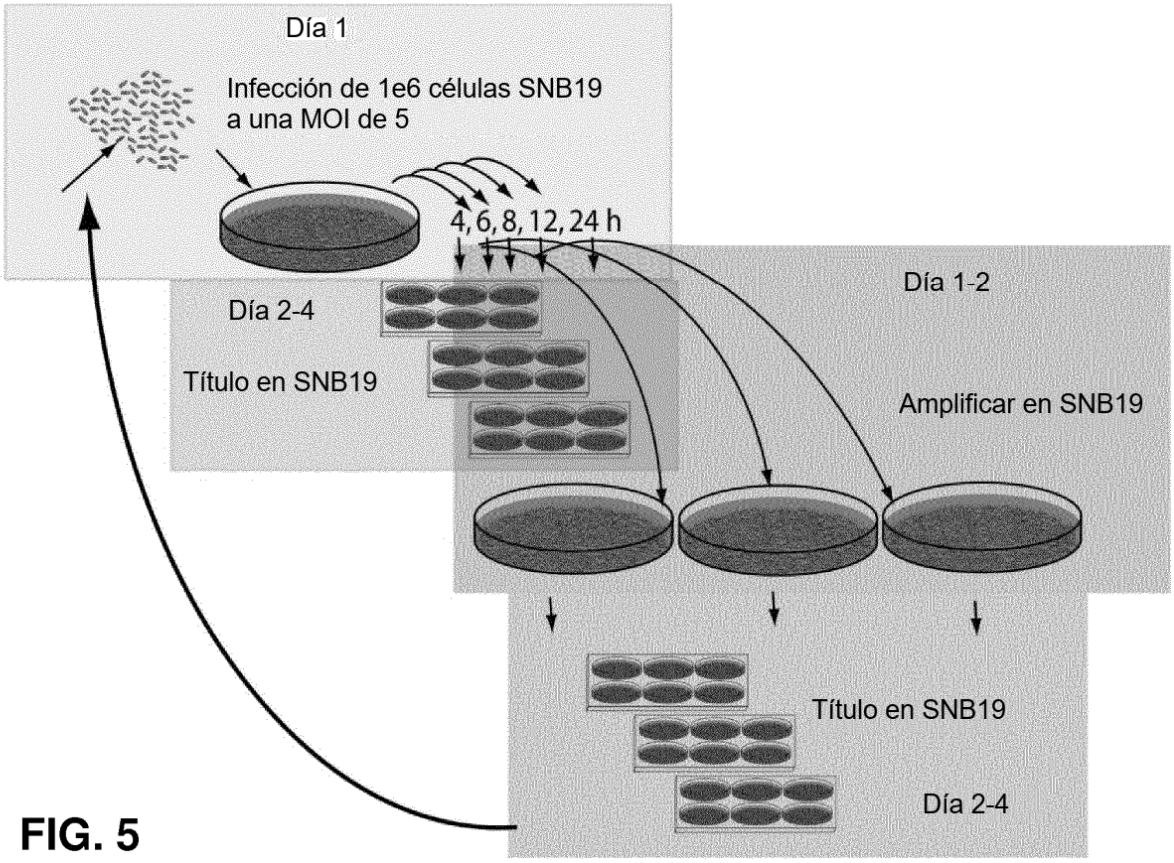


FIG. 5

Evolución dirigida

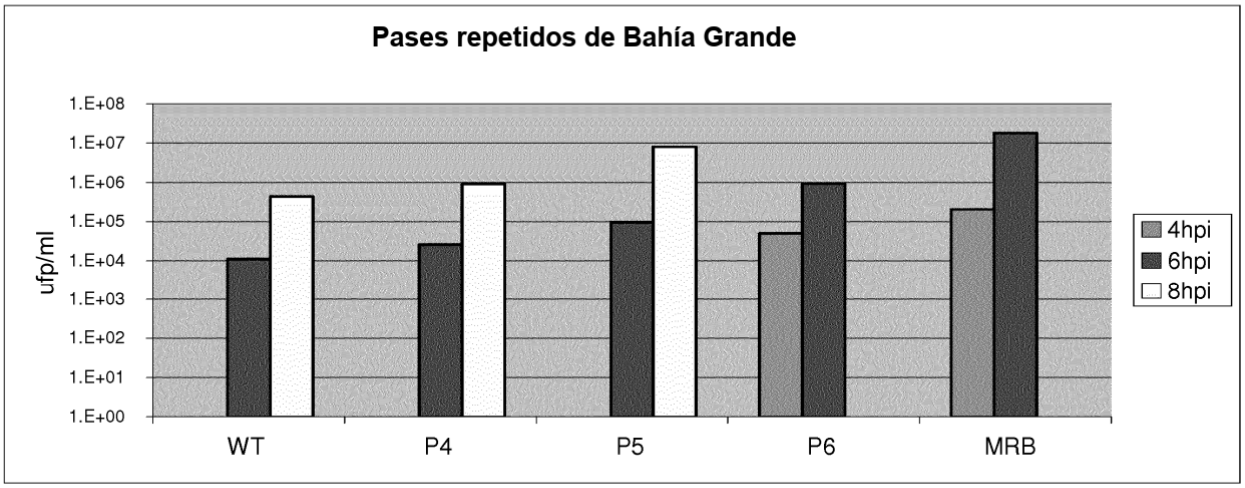


FIG. 6

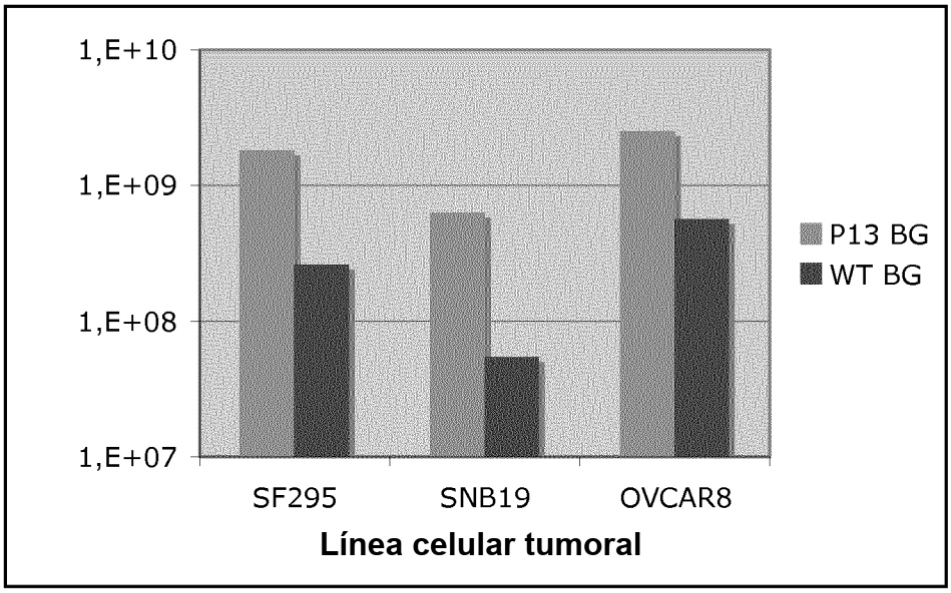

1,E+10
1,E+09
1,E+08
1,E+07
SF295
SNB19
OVCAR8
Línea celular tumoral
P13 BG
WT BG

FIG. 7

Bahía Grande y Muir Springs no muestran neurotoxicidad

Toxicidad intracraneal

	I.C (LD, pfu)
WT VSV	<10
VSV delta M51	<10
Bahia Grande	$>1e^7$
Muir Springs	$>1e^7$
Bahia Grande P6	$>1e^7$

FIG. 8

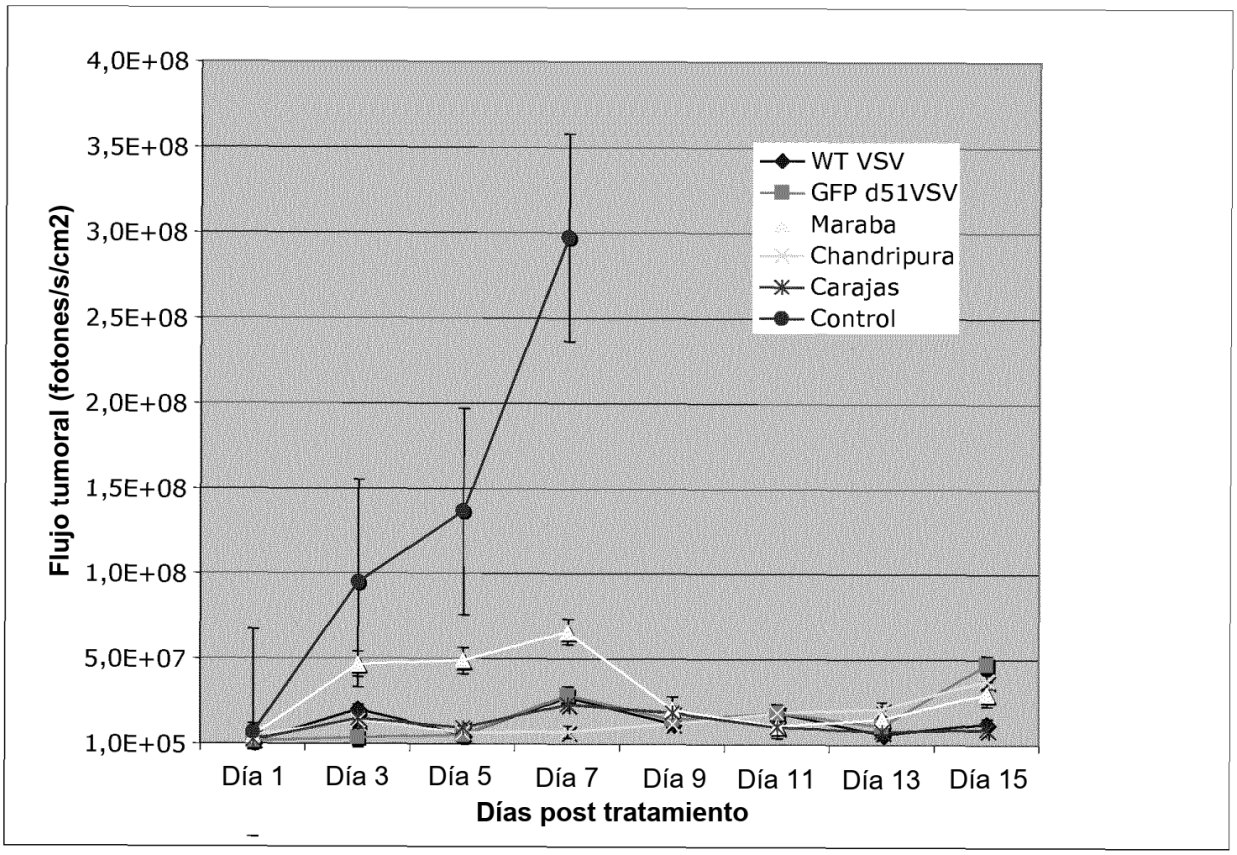

4,0E+08
3,5E+08
3,0E+08
2,5E+08
2,0E+08
1,5E+08
1,0E+08
5,0E+07
1,0E+05
Flujo tumoral (fotones/s/cm2)
Día 1
Día 3
Día 5
Día 7
Día 9
Día 11
Día 13
Día 15
Días post tratamiento
WT VSV
GFP d51VSV
Maraba
Chandripura
Carajas
Control

FIG. 9

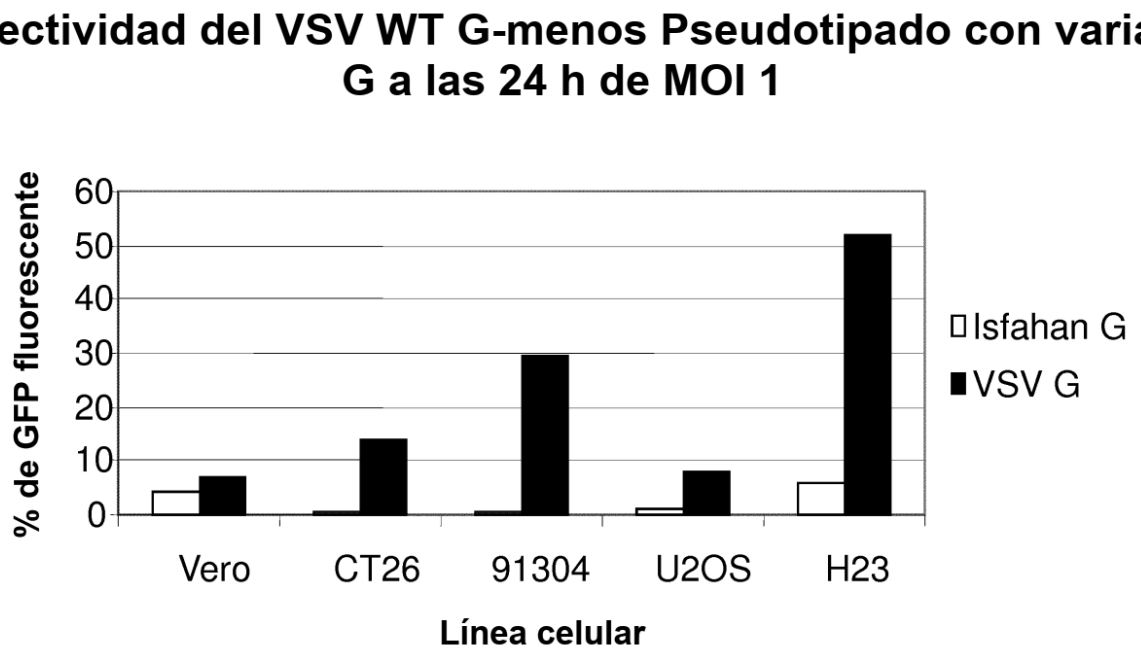

Infectividad del VSV WT G-menos Pseudotipado con varias G a las 24 h de MOI 1
% de GFP fluorescente
60
50
40
30
20
10
0
Vero
CT26
91304
U2OS
H23
Línea celular
Isfahan G
VSV G

FIG. 10

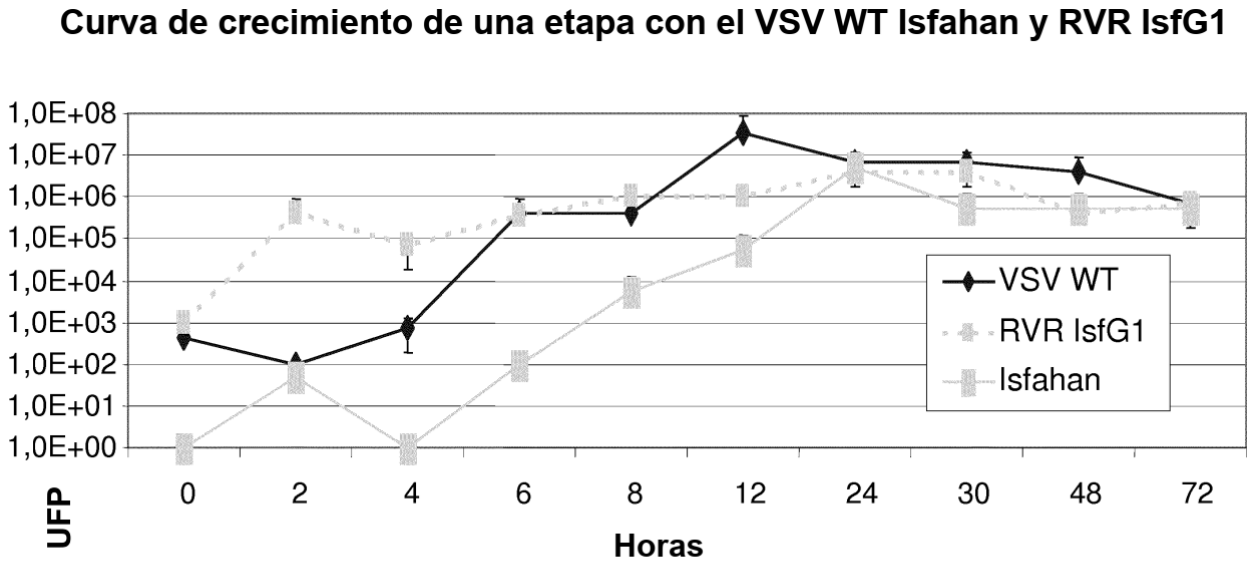

Curva de crecimiento de una etapa con el VSV WT Isfahan y RVR IsfG1
1,0E+08
1,0E+07
1,0E+06
1,0E+05
1,0E+04
1,0E+03
1,0E+02
1,0E+01
1,0E+00
UFP
0
2
4
6
8
12
24
30
48
72
Horas
VSV WT
RVR IsfG1
Isfahan

FIG. 11

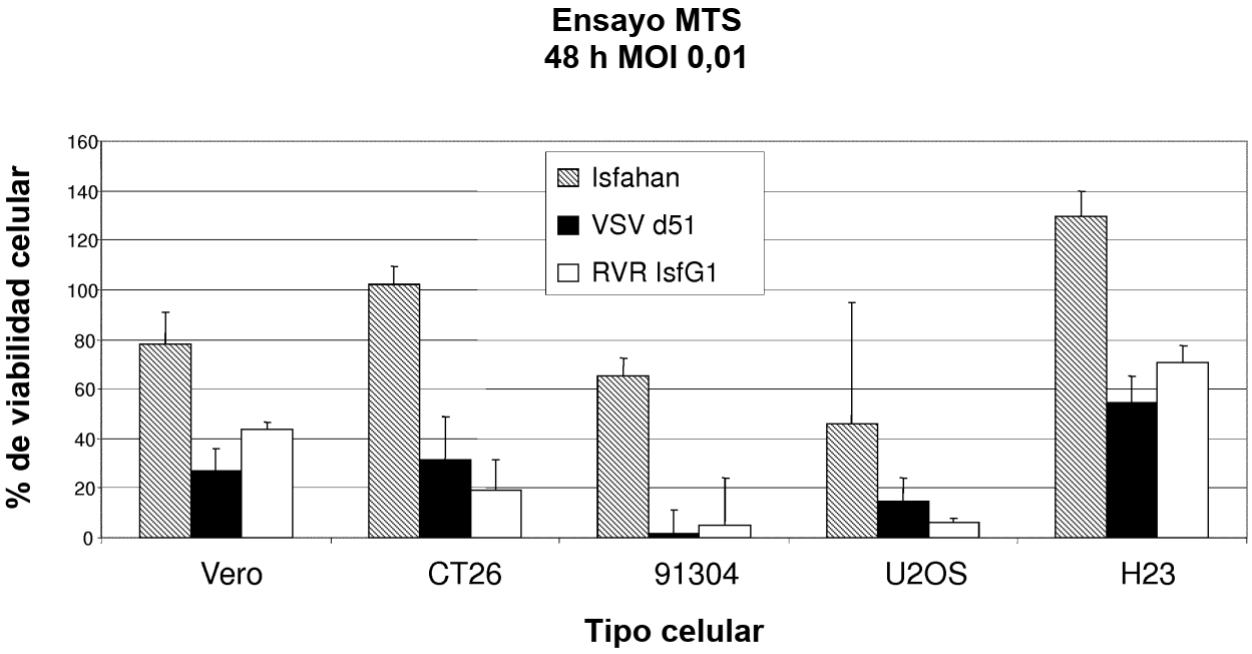
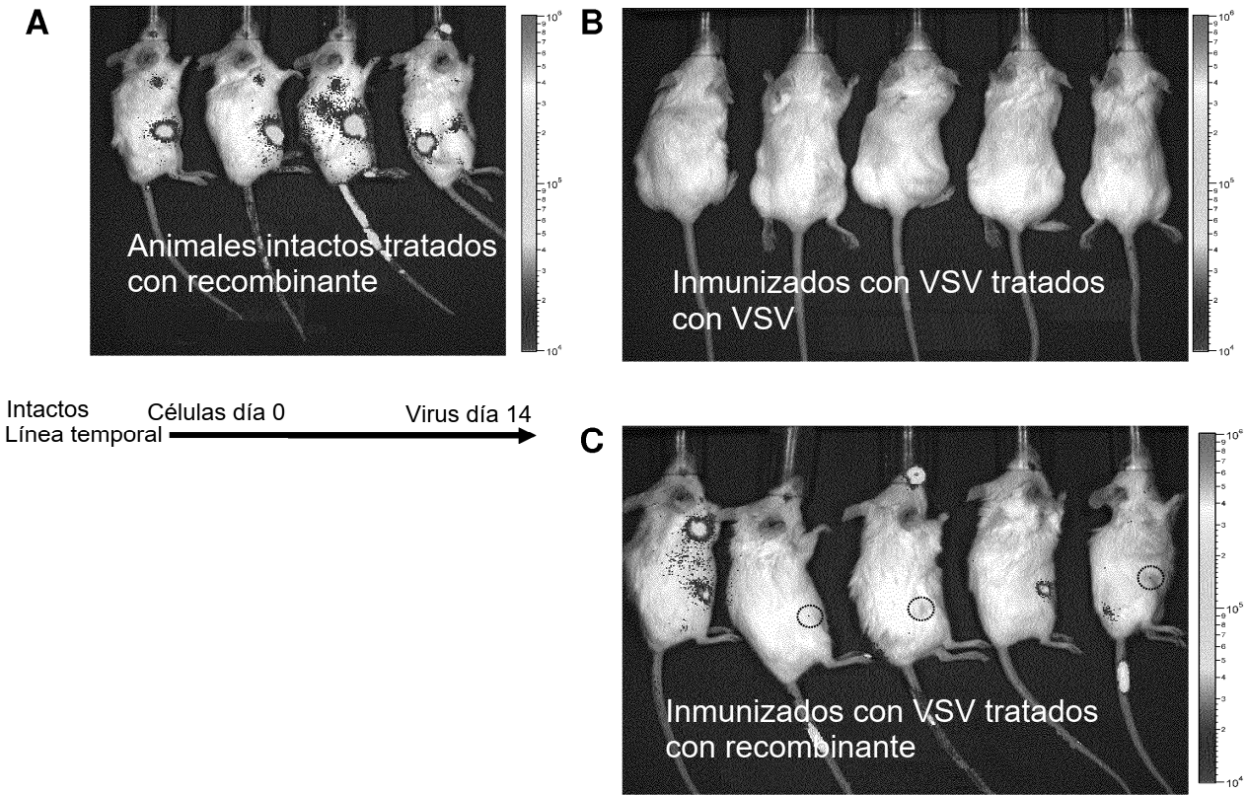

Ensayo MTS
48 h MOI 0,01
% de viabilidad celular
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Isfahan
VSV d51
RVR IsfG1
Vero
CT26
91304
U2OS
H23
Tipo celular

FIG. 12


A
Animales intactos tratados con recombinante
B
Inmunizados con VSV tratados con VSV
Intactos
Línea temporal
Células día 0
Virus día 14
C
Inmunizados con VSV tratados con recombinante

FIGs. 13A-13C

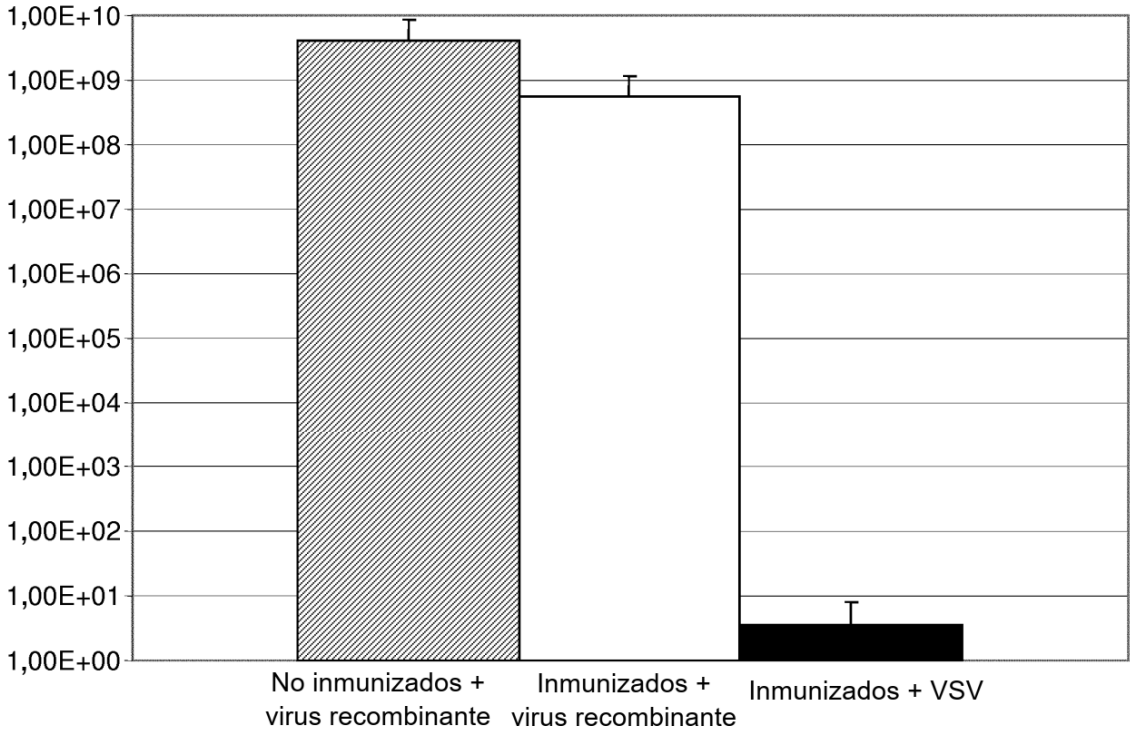

1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
1,00E+02
1,00E+01
1,00E+00
No inmunizados + virus recombinante
Inmunizados + virus recombinante
Inmunizados + VSV

FIG. 14

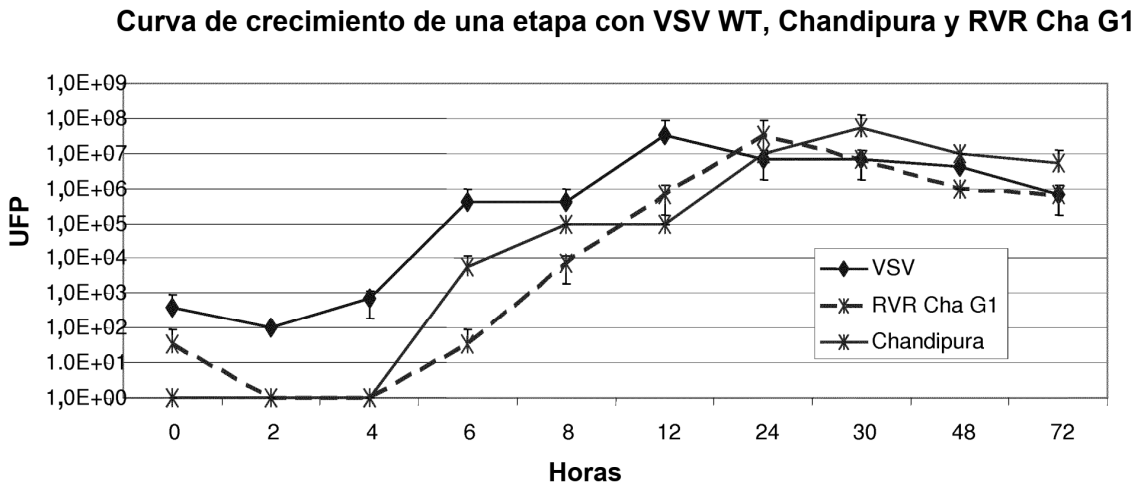

Curva de crecimiento de una etapa con VSV WT, Chandipura y RVR Cha G1
UFP
1,0E+09
1,0E+08
1,0E+07
1,0E+06
1,0E+05
1,0E+04
1,0E+03
1,0E+02
1.0E+01
1,0E+00
0
2
4
6
8
12
24
30
48
72
Horas
VSV
RVR Cha G1
Chandipura

FIG. 15

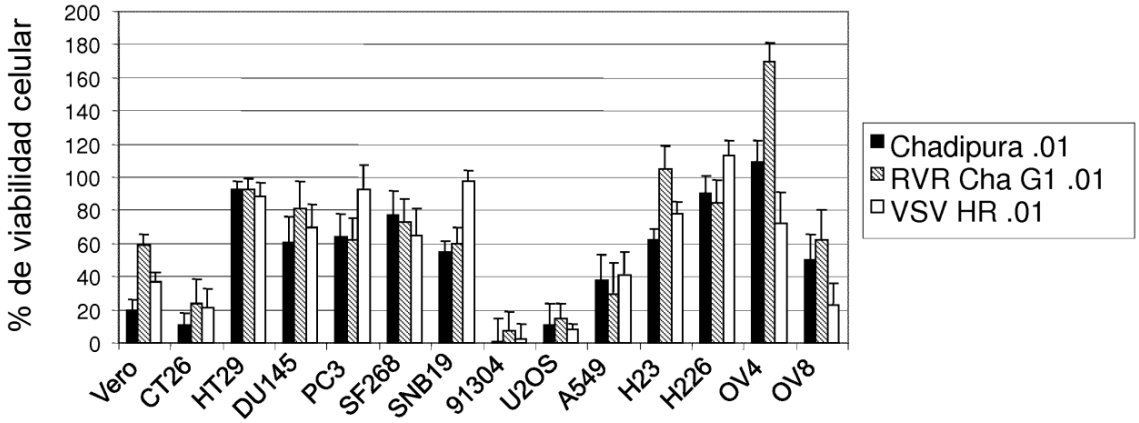

% de viabilidad celular
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Vero
CT26
HT29
DU145
PC3
SF268
SNB19
91304
U2OS
A549
H23
H226
OV4
OV8
Chadipura .01
RVR Cha G1 .01
VSV HR .01

FIG. 16

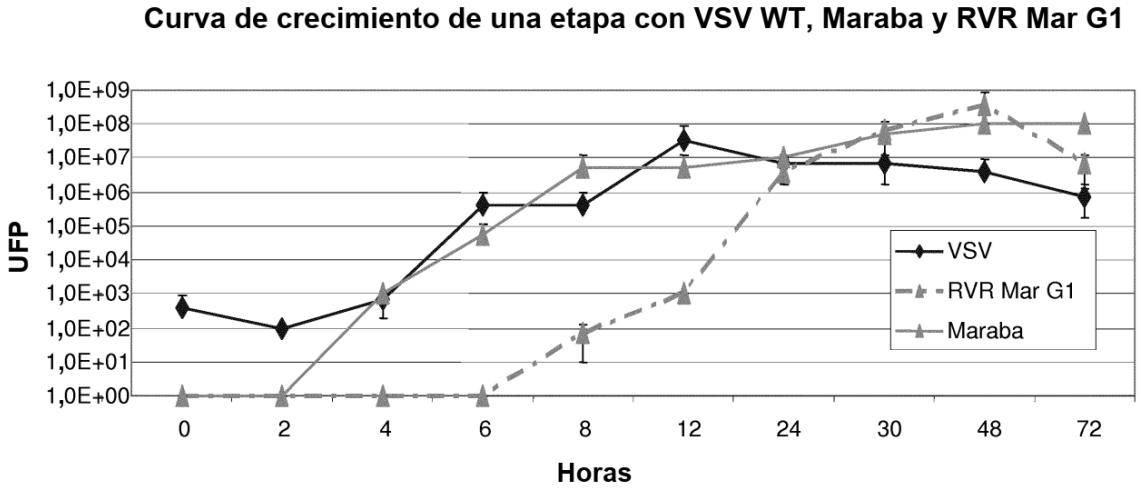

Curva de crecimiento de una etapa con VSV WT, Maraba y RVR Mar G1
UFP
1,0E+09
1,0E+08
1,0E+07
1,0E+06
1,0E+05
1,0E+04
1,0E+03
1,0E+02
1,0E+01
1,0E+00
0
2
4
6
8
12
24
30
48
72
Horas
VSV
RVR Mar G1
Maraba

FIG. 17

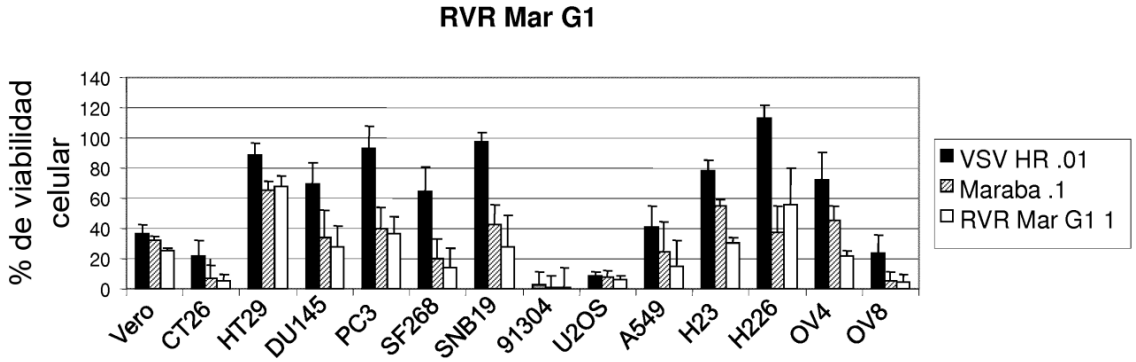

RVR Mar G1
% de viabilidad celular
140
120
100
80
60
40
20
0
Vero
CT26
HT29
DU145
PC3
SF268
SNB19
91304
U2OS
A549
H23
H226
OV4
OV8
VSV HR .01
Maraba .1
RVR Mar G1 1

FIG. 18