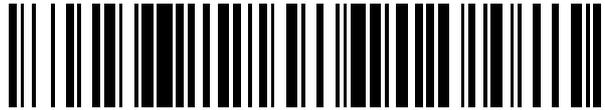


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 381**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
C12N 7/00	(2006.01)
A61K 39/21	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/US2015/018156**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15134332**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15758863 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3113795**

54 Título: **Vectores víricos Isfahan recombinantes**

30 Prioridad:

01.03.2014 US 201461946734 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2020

73 Titular/es:

THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US y
PROFECTUS BIOSCIENCES, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MATASSOV, DEMETRIUS;
GORCHAKOV, RODION, V.;
HAMM, STEFAN;
NOWAK, REBECCA;
SEYMOUR, ROBERT, L.;
ELDRIDGE, JOHN, H.;
TESH, ROBERT, B.;
CLARKE, DAVID, K.;
LATHAM, THERESA, E.;
WEAVER, SCOTT y
NASAR, FAROOQ

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 749 381 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores víricos Isfahan recombinantes

5 **Antecedentes**

El virus de la estomatitis vesicular recombinante (rVSV, de sus siglas en inglés) se ha desarrollado como una plataforma vectorial para una variedad de patógenos humanos (Finke y Conzelmann. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2005, 292:165-200; Jones et al. *Nature Medicine*. 2005, 11(7):786-90; Kahn et al. *Journal of Virology*. 2001, 75(22):11079-87; Kapadia et al. *Virology*. 2005, 340(2):174-82; Reuter et al. *Journal of Virology*. 2002, 76(17):8900-9; Roberts et al. *Journal of Virology*. 1999, 73(5):3723-32; Roberts et al. *J Virol*. 1998, 72(6):4704-11; Rose et al. *Cell*. 2001, 106(5):539-49), y un vector rVSV optimizado que expresa la proteína gag del VIH-1 ha completado la evaluación clínica (HVTN 090: accesible a través de la web mundial en URL clinicaltrials.gov/). A pesar de estos avances, quedan desafíos en el desarrollo de la plataforma del vector rVSV, incluida la posible inmunidad generada contra las proteínas del vector que pueden interferir con las inmunizaciones de refuerzo posteriores con vectores rVSV. Este posible problema se puede superar cuando los vectores rVSV se usan en regímenes de inmunización de sensibilización-refuerzo heterólogos con otros vectores inmunológicamente distintos (Amara et al. *Science*. 2001, 292(5514):69-74; Amara et al. *J Virol*. 2002, 76(15):7625-31; Egan et al. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2005, 21(7):629-43; Hanke et al. *J Virol*. 1999, 73(9):7524-32; Ramsburg et al. *Journal of Virology*. 2004, 78(8):3930-40; Santra et al. *J Virol*. 2007; Xu et al. *Journal of Virology*. 2009, 83(19):9813-23). El cambio de serotipo de los vectores rVSV, logrado mediante el intercambio de la proteína G de superficie con la de un serotipo de vesiculovirus diferente, también aumenta la inmunogenicidad en los regímenes de sensibilización-refuerzo en ratones (Rose et al. *Journal of Virology*. 2000, 74(23):10903-10). Sin embargo, la reactividad cruzada de las respuestas inmunes celulares dirigidas hacia las proteínas centrales de rVSV puede limitar este enfoque.

En vista de estas observaciones y posibles limitaciones, existe una necesidad de vectores heterólogos adicionales para su uso solos o en combinación con vectores rVSV.

30 **Sumario**

Las realizaciones de la invención incluyen composiciones inmunogénicas y procedimientos relacionados con los vesiculovirus, tales como el virus Isfahan (ISFV, de sus siglas en inglés) solo o en combinación con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y su uso como agentes terapéuticos y/o profilácticos. Determinados aspectos incluyen procedimientos y composiciones inmunogénicas que comprenden un vesiculovirus recombinante que codifica uno o más polipéptidos heterólogos. "Virus recombinante" se refiere a cualquier virión o genoma vírico que sea igual o diferente a un virus de tipo silvestre debido a una reordenación, eliminación, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos en el genoma vírico de tipo silvestre. En particular, la expresión incluye virus recombinantes generados por la intervención de un ser humano. En determinados aspectos, el vesiculovirus es un virus recombinante Isfahan (rISFV, de sus siglas en inglés). En determinados aspectos, el rISFV es un virus competente en replicación. Aplicado a un virus recombinante, "competente en replicación" significa que el virus es capaz de infección celular; replicación del genoma vírico; y producción y liberación de nuevas partículas víricas; aunque no es necesario que una o más de estas características ocurran a la misma velocidad que en el mismo tipo celular infectado por un virus de tipo silvestre, y pueden ocurrir a una velocidad más rápida o más lenta.

En un aspecto adicional, el rISFV comprende (i) una proteína N que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, (ii) una proteína P que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, (iii) una proteína M que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, (iv) una proteína G que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y (v) una proteína L que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

El rISFV comprende además una unidad de transcripción (UT) heteróloga. Una unidad de transcripción se refiere a una secuencia polinucleotídica heteróloga (a) flanqueada por una señal de inicio de la transcripción y una señal de parada de la transcripción (que incluye una secuencia de poliadenilación), y (b) que codifica uno o más polipéptidos heterólogos diana. En determinadas realizaciones, la UT heteróloga es la 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a o 6^a UT en el genoma del virus. En determinados aspectos, la UT heteróloga codifica dos o más polipéptidos heterólogos. En otros aspectos, se incluyen dos UT heterólogas en el genoma del virus, con una UT heteróloga insertada en una posición en el genoma del virus y la segunda UT heteróloga insertada en una posición diferente en el genoma del virus.

Otro mecanismo para expresar una secuencia polinucleotídica heteróloga es unir la secuencia heteróloga a un gen ISF a través de un péptido 2A. Las expresiones "2A", "péptido 2A" o "péptido similar a 2A" se refieren a péptidos que se han utilizado con éxito para generar múltiples proteínas a partir de un único marco de lectura abierto. Estos péptidos son pequeños (18-22 aminoácidos) y tienen secuencias aminoterminal divergentes, pero todos contienen un motivo PGP en el extremo C. A través de un mecanismo de omisión ribosómica, el péptido 2A evita la formación normal de enlaces peptídicos entre una glicina y un resto de prolina en el extremo C del péptido. Estas secuencias

de tipo 2A y 2A son conocidas en la materia y pueden seleccionarse fácilmente para dicho uso. Véase, por ejemplo, Szymczak-Workman et al, en Cold Spring Harbor Protocols 2012, doi 10.1101/pdb.ip067876; y Friedmann y Rossi (eds), Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY EE.UU., 2007, entre otros. Uno de estos péptidos 2A es el péptido T2A, que se aísla del virus *Thosea asigna* y tiene la secuencia EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 68). En aspectos adicionales, se puede incluir un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES, de sus siglas en inglés) en un gen que codifica al menos dos polipéptidos para permitir la transcripción independiente de la caperuza de la región de codificación cadena abajo. Se conocen varias secuencias de IRES y se pueden seleccionar de la base de datos de IRESite que está disponible en la red mundial en iresite.org.

En determinados aspectos, el gen G de rISFV codifica una proteína G que tiene un truncamiento carboxiterminal, en particular un truncamiento de 20 a 25 aminoácidos. En determinados aspectos, el genoma de rISFV comprende en 3' a 5' una secuencia líder de ISFV, un marco de lectura abierta (ORF, de sus siglas en inglés) de la proteína P de ISFV, un ORF de la proteína M de ISFV, un ORF de la proteína G de ISFV, un ORF de la proteína N de ISFV, un ORF de la proteína L de ISFV y una secuencia de avance de ISFV, junto con la secuencia polinucleotídica heteróloga o la UT heteróloga en cualquier posición dentro del genoma de rISFV. En determinados aspectos, la UT heteróloga se encuentra en la posición 5 del genoma de rISFV. En determinados aspectos, el polinucleótido heterólogo codifica un polipéptido inmunogénico. En otros aspectos, el polinucleótido heterólogo codifica uno o más antígenos. El antígeno puede ser un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno específico de tumor o cáncer, un antígeno parásito o un alérgeno.

Determinadas realizaciones están dirigidas a un rISFV con un orden de genes, de 3' a 5' en relación con el ARN de sentido (-), de N-P-M-G-L-(H), N-P-M-G-(H)-L, N-P-M-(H)-G-L, N-P-(H)-M-G-L, N-(H)-P-M-G-L, (H)-N-P-M-G-L, P-N-M-G-L-(H), P-N-M-G-(H)-L, P-N-M-(H)-G-L, P-N-(H)-M-G-L, P-(H)-N-M-G-L, (H)-P-N-M-G-L, P-M-N-G-L-(H), P-M-N-G-(H)-L, P-M-N-(H)-G-L, P-M-(H)-N-G-L, P-(H)-M-N-G-L, (H)-P-M-N-G-L, P-M-G-N-L-(H), P-M-G-N-(H)-L, P-M-G-(H)-N-L, P-M-(H)-G-N-L, P-(H)-M-G-N-L, (H)-P-M-G-N-L, P-M-G-L-N-(H), P-M-G-(H)-L-N, P-M-G-L(H)-N, P-M-(H)-G-L-N, P-(H)-M-G-L-N o (H)-P-M-G-L-N en el que (H) es una UT que comprende al menos un polinucleótido heterólogo. En determinados aspectos, el rISFV tiene un orden genético P-M-G-N-(H)-L. En determinados aspectos, el genoma de rISFV está codificado en un vector de expresión. En una realización adicional, el vector de expresión es un vector de ADN, por ejemplo, un vector plasmídico. Las expresiones "combinación de genes", "gen barajado", "barajado", "combinado", "reordenamiento génico" y "translocación génica" se usan indistintamente y se refieren a una alteración en el orden de los genes del vesiculovirus en el genoma vírico.

Determinadas realizaciones están dirigidas a un vector de expresión que codifica el ARN recombinante de sentido negativo descrito anteriormente. En determinados aspectos, el vector de expresión es un vector de ADN.

Otras realizaciones están dirigidas a una célula huésped que comprende el vector de expresión descrito anteriormente. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vector de expresión" pretende incluir un plásmido o virus que es capaz de sintetizar una secuencia polinucleotídica heteróloga codificada por el vector. En determinados aspectos, un vector se puede replicar y expresar un ácido nucleico codificado.

Aún otras realizaciones están dirigidas a una partícula vírica que comprende el ARN recombinante descrito anteriormente. Como se usa en el presente documento, una "partícula vírica" es una entidad infecciosa que proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más polipéptidos para expresarse en un huésped.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir partículas víricas que comprenden los ácidos nucleicos recombinantes descritos en el presente documento. Determinados aspectos están dirigidos a procedimientos para inducir una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Los procedimientos y composiciones de la invención pueden incluir un segundo virus terapéutico. Se puede seleccionar un segundo virus entre adenovirus recombinantes u oncolíticos, virus vaccinia, virus de la enfermedad de Newcastle, virus del herpes y rabdovirus. En otros aspectos, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos, el segundo virus terapéutico es un rVSV. En un aspecto adicional, el rVSV codifica el mismo antígeno o un antígeno relacionado presente en o sobre la misma célula u organismo diana.

Se puede administrar un vesiculovirus recombinante (por ejemplo, rISFV como se describe en el presente documento) a un sujeto que necesita una respuesta inmune terapéutica o profiláctica. Las composiciones de vesiculovirus recombinantes se pueden administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces con uno o más vesiculovirus recombinantes. La composición administrada puede tener 10, 100, 1000, 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 placa (ufp). La administración puede ser por vía intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intratumoral (para tumores sólidos), intramuscular, intradérmica, subcutánea, oral o intranasal. En determinados aspectos, las composiciones se administran sistemáticamente, de manera particular, mediante administración intravascular, que incluye inyección, perfusión y similares.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender además administrar una segunda terapia antineoplásica o antibiótica. En determinados aspectos, un segundo agente antineoplásico es un quimioterapéutico, un radioterapéutico, un inmunoterapéutico, cirugía o similar. En otros aspectos, un segundo tratamiento antibiótico es un antibiótico o un antivírico.

5 rISFV es serológica y filogenéticamente diferente de rVSV. Esta distinción se puede utilizar para optimizar la eficacia protectora y la inmunogenicidad de un régimen inmunoestimulante. Los vectores rISFV y rVSV se pueden emplear en regímenes de sensibilización-refuerzo. Se puede usar un primer vesiculovirus recombinante en cualquier número de combinaciones con un segundo vesiculovirus recombinante.

10 El término "proporcionar" o "administrar" se usa de acuerdo con su significado ordinario "suministrar o facilitar para su uso". En algunas realizaciones, se proporciona un antígeno mediante administración directa (por ejemplo, mediante inyección intramuscular), mientras que, en otras realizaciones, el antígeno se proporciona eficazmente mediante la administración de un ácido nucleico que codifica el antígeno. En determinados aspectos, la invención contempla composiciones que comprenden diversas combinaciones de ácido nucleico, antígenos, péptidos y/o epítomos.

20 En determinados aspectos, una partícula vírica, polipéptido o ácido nucleico puede ser una partícula vírica, polipéptido o ácido nucleico aislado. El término "aislado" puede referirse a una partícula vírica, ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, material bacteriano, material vírico o medio de cultivo (por ejemplo, cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante) de su fuente de origen, o precursores químicos u otros productos químicos (por ejemplo, cuando se sintetizan químicamente). Además, un compuesto aislado se refiere a uno que puede administrarse a un sujeto como un compuesto aislado; en otras palabras, el compuesto no puede considerarse simplemente "aislado" si se adhiere a una columna o se integra en un gel de agarosa. Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" o "péptido aislado" es un fragmento de ácido nucleico o proteína que no se produce de forma natural como un fragmento y/o no está normalmente en el estado funcional.

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

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o procedimiento empleado para determinar el valor.

35 El uso del término "o" en las reivindicaciones, se usa para significar "y/o", a menos que se indique explícitamente, se refiere solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o".

40 Como se usa en esta especificación y en la(s) reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluyen" e "incluye") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contienen" y "contiene") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos adicionales no citados o etapas del procedimiento.

45 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y ámbito de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

50 Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones de especificación presentadas en el presente documento.

60 La Figura 1 es un árbol filogenético de máxima probabilidad del género *Vesiculovirus* basado en secuencias de nucleótidos del gen N.

La Figura 2 representa los sitios de restricción utilizados en la estrategia de clonación para la generación de un clon de ADNc genómico completo de Isfahan.

65 La Figura 3A es un diagrama de un vector rISFV [también denominado rISFV-N4-G3-(VEEV ZPC E3-E1)5] que codifica una poliproteína E3-E2-6K-E1 del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV); La Figura 3B es una transferencia Western que representa la expresión de proteínas del VEEV (carril 3).

La Figura 4 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de la proteína N de varios vesiculovirus. Las regiones de homología de aminoácidos están sombreadas.

5 La Figura 5 es una fotografía de los tamaños de placa observados generados por varios rISFV que expresan una proteína gag del VIH-1 modificada.

10 La Figura 6 representa el porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con rISFV-N4 [también denominado rISFV-N4-G3-(EEEV FL93 E3-E1)5] que expresa proteínas E3-E1 de la cepa FL93 del virus de la encefalitis equina del este (EEEV, de sus siglas en inglés), seguido de una exposición letal con EEEV-FL93.

15 La Figura 7 representa el porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con rISFV-N4 [también denominado rISFV-N4-G3-(VEEV ZPC E3-E1)5] que expresan proteínas E3-E1 de la cepa ZPC del VEEV, seguido de una exposición letal con VEEV-ZPC.

20 La Figura 8 representa el porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con rISFV-N4 [también denominado rISFV-N4-G3-(VEEV ZPC E3-E1)5] que expresa proteínas E3-E1 del VEEV-ZPC en 10^8 o 10^7 ufp y del serotipo rVSV Indiana N4CT1 (rVSV_{IN}N4CT1) [también denominado rVSV_{IN}-N4-G3-(VEEV ZPC E3-E1)5] que expresa las proteínas E3-E1 del VEEV-ZPC a 10^8 o 10^7 ufp, seguido de una exposición letal con VEEV-ZPC.

25 La Figura 9 representa el porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con rISFV-N4 que expresan proteínas E3-E1 del EEEV-FL93 y con rISFV-N4 que expresan proteínas E3-E1 del VEEV-ZPC [juntas, también denominadas rISFV-N4G3-(VEEV ZPC E3-E1)5/rISFV-N4-G3-(EEEV FL93 E3-E1)5], seguido de una exposición letal con EEEV-FL93.

30 La Figura 10 representa el porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con rISFV-N4 que expresan proteínas E3-E1 del EEEV-FL93 y con rISFV-N4 que expresan proteínas E3-E1 del VEEV-ZPC [juntas, también denominadas rISFV-N4G3-(VEEV ZPC E3-E1)5/rISFV-N4-G3-(EEEV FL93 E3-E1)5], seguido de una exposición letal con VEEV-ZPC.

35 La Figura 11 ilustra los cuatro aminoácidos que se pueden cambiar en la secuencia de la proteína N sin afectar negativamente la función biológica. Un epítipo conocido en ratones BALB/c está subrayado.

La Figura 12 ilustra virus recombinantes probados en el estudio PBS-Mu-062a.

35 La Figura 13 es un resumen del diseño del estudio PBS-Mu-062a.

40 La Figura 14 ilustra respuestas ELISpot del interferón gamma (IFN- γ) a un epítipo gag del VIH-1 en el estudio PBS-Mu-062a. La Figura 15 ilustra los rISFV probados en el estudio de sensibilización/refuerzo PBS-Mu-062b.

La Figura 16 es un resumen del diseño del estudio PBS-Mu-062b.

45 La Figura 17 ilustra respuestas ELISpot del IFN- γ a un epítipo dominante único de Gag del VIH-1 en el estudio PBS-Mu-062b.

La Figura 18 ilustra respuestas ELISpot del IFN- γ a VSV-N en el estudio PBS-Mu-062b.

50 La Figura 19 representa los pesos corporales de ratones inmunizados con rISFV-N4G-CTA25(CHIKV GP)1 frente a ratones no inmunizados después de la exposición con el aislado LaReunion de CHIKV.

La Figura 20 representa la hinchazón de la almohadilla plantar de ratones inmunizados con rISFV-N4G-CTA25(CHIKV GP)1 frente a ratones no inmunizados después de la exposición con el aislado LaReunion de CHIKV.

55 La Figura 21 representa la viremia de ratones inmunizados con rISFV-N4G-CTA25(CHIKV GP)1 frente a ratones no inmunizados después de la exposición con el aislado LaReunion de CHIKV.

60 La Figura 22 representa la supervivencia de ratones inmunizados con rISFV-N4G-CTA25(CHIKV GP)1, seguido de una exposición letal con el aislado LaReunion de CHIKV.

Descripción

65 El virus Isfahan (ISFV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) son miembros del género *Vesiculovirus* en la familia *Rhabdoviridae*. Los rhabdovirus prototípicos son el virus de la rabia (RV, de sus siglas en inglés) y el VSV. La *Rhabdoviridae* es una familia de virus en forma de bala que tiene genomas de ARN de sentido (-) de cadena simple no segmentados. Hay más de 250 rhabdovirus conocidos que infectan mamíferos, peces, insectos o plantas. La

familia comprende al menos 5 géneros: (1) *Lyssavirus*: que incluye el RV, otros virus de mamíferos y algunos virus de insectos; (2) *Vesiculovirus*: que incluye el VSV; (3) *Ephemerovirus*: que incluye el virus de la fiebre efímera bovina; (4) *Cytorhabdovirus*: que incluye virus del amarilleamiento necrótico de la lechuga; y (5) *Nucleorhabdovirus*: que incluye el virus del enanismo amarillo de la patata.

5 El genoma de ARN vírico de sentido negativo (ARNv) de rabdovirus tiene una longitud aproximada de 11 a 15 kb con una secuencia líder de aproximadamente 50 nucleótidos en 3' y una secuencia de avance no traducida de aproximadamente 60 nucleótidos en 5'. El ARN genómico vírico (ARNv) del rabdovirus generalmente contiene 5 genes que codifican 5 proteínas principales: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glucoproteína (G) y proteína grande (L) (también conocida como la polimerasa). Los rabdovirus tienen una señal de poliadenilación conservada en el extremo 5' de cada gen y una región intergénica corta no transcrita entre cada uno de los 5 genes. Normalmente, estos genes están en el orden 3'-N-P-M-G-L-5' del genoma vírico. El orden de los genes dicta los niveles de expresión de proteínas en la célula infectada. Cualquier manipulación de un genoma de rabdovirus para producir un virus infeccioso incluirá normalmente al menos cinco unidades de transcripción (UT) que codifican al menos 4, y generalmente 5, de las proteínas víricas principales para mantener la capacidad de infectar y replicarse a niveles altos.

I. VESICULOVIRUS RECOMBINANTES

20 Se ha demostrado que los genomas de vesiculovirus acomodan más de un gen extraño que abarca al menos tres kilobases (kb) de secuencia de nucleótidos adicional. Los vectores de vesiculovirus, que han sido suficientemente atenuados (mediante, por ejemplo, combinación de genes y/o truncamiento de proteínas víricas), han demostrado estabilidad genética, y el genoma del virus no experimenta recombinación detectable. Además, dado que la replicación vírica es citoplasmática, el ARN genómico vírico no se integra en el genoma de la célula huésped. También, estos virus de ARN de cadena negativa poseen secuencias de control transcripcional relativamente simples y bien caracterizadas, que permiten una expresión consistente de genes extraños. El nivel de expresión de genes extraños puede modularse mediante el cambio de la posición del gen extraño con respecto al promotor único de transcripción vírica en 3' (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6.136.585 y 8.287.878, entre otras). El gradiente de 3' a 5' de expresión génica refleja la probabilidad decreciente de que la ARN polimerasa dependiente de ARN vírico transcribirá con éxito cada señal de parada/inicio de la transcripción encontrada en las uniones genéticas a medida que avanza a lo largo de la plantilla del genoma. Por lo tanto, los genes extraños colocados cerca del promotor de transcripción terminal en 3' se expresan abundantemente, mientras que los insertados en posiciones genómicas más distales, menos.

35 El VSV se replica a títulos altos en una gran variedad de diferentes tipos de células, y las proteínas víricas se expresan en gran abundancia. Esto no solo significa que el VSV actuará como un posible vector de expresión de genes extraños funcionales, sino también, que los vectores rVSV relevantes pueden graduarse a niveles de fabricación en líneas celulares aprobadas para la producción de productos biológicos humanos. Este vector de virus competente en replicación produce pocos o ningún síntoma de enfermedad o patología en seres humanos sanos, incluso ante una replicación vírica sustancial (Tesh, R. B. et al, 1969 Am. J. Epidemiol., 90:255-61). Además, la infección humana con y, por lo tanto, la inmunidad preexistente a, VSV es rara. Por lo tanto, el rVSV es útil como vector.

45 Si bien se han desvelado una variedad de rVSV en la materia con sus genes "barajados" en posiciones del genoma diferentes de las del VSV de tipo silvestre (véase la Patente de Estados Unidos N.º 8.287.878; la Patente de Estados Unidos N.º 6.596.529, y referencias citadas allí), puede ser útil para que el gen N esté en la cuarta posición (N4) en el orden génico del VSV como parte de una combinación de mutaciones, de modo que el virus esté suficientemente atenuado. Para atenuar más rVSV, la cola citoplasmática de la proteína G puede truncarse (G-CT).

50 Diversas realizaciones del rVSV descritas anteriormente emplean secuencias VSV procedentes del serotipo VSV Indiana. Sin embargo, otros vesiculovirus conocidos (por ejemplo, el virus Isfahan) o los serotipos VSV pueden sustituirse fácilmente por las secuencias ejemplificadas de las realizaciones descritas dadas las enseñanzas de esta especificación.

55 Los promotores adecuados para su uso en la generación de vectores descritos en el presente documento pueden seleccionarse de promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos de tejido y otros. Los ejemplos de promotores constitutivos que no son específicos en su actividad y se emplean en la expresión de moléculas de ácido nucleico de esta invención incluyen, sin limitación, aquellos promotores identificados en la Solicitud de Patente Internacional N.º WO2004/093906 y la Patente de Estados Unidos N.º 8.287.878. El promotor de hCMV se usa para expresar proteínas del VSV para fines de rescate del rVSV en una técnica de genética inversa. Otros promotores de pol II que pueden usarse incluyen, entre otros, el promotor de ubiquitina C (UbiC), el promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK, de sus siglas en inglés), el promotor de citomegalovirus bovino (bCMV, de sus siglas en inglés), un promotor de beta-actina con un potenciador de CMV IV cadena arriba (CAGGS) y el promotor alfa del factor de alargamiento 1 (EF1A, de sus siglas en inglés). En determinadas realizaciones, se usa el promotor de ARN polimerasa T7.

Determinadas realizaciones de la invención están dirigidas a vesiculovirus recombinantes, incluidos el virus de Isfahan recombinante (rISFV) solo o en combinación con el virus de la estomatitis vesicular recombinante (rVSV), por ejemplo, en un régimen de sensibilización/refuerzo, así como vectores que codifican los vesiculovirus recombinantes y los procedimientos de uso de dichos vesiculovirus y vectores recombinantes. Los vesiculovirus recombinantes se pueden producir (1) utilizando transfecciones de ADNc o (2) ADNc transfectados en una célula, que además se infecta con un minivirus que proporciona in trans los componentes o actividades restantes necesarios para producir un vesiculovirus recombinante. Al usar cualquiera de estos procedimientos (por ejemplo, minivirus, línea celular auxiliar o transfección de ADNc), los componentes mínimos para producir un ARN empaquetado requieren una molécula de ARN que contenga las señales que actúan in cis para (1) la encapsidación del ARN genómico por la proteína N, y (2) la replicación de un ARN genómico equivalente.

Un elemento replicante o replicón es una cadena de ARN que contiene mínimamente en los extremos 3' y 5' la secuencia líder y la secuencia de avance de un vesiculovirus; en el genoma de sentido (-), la líder está en el extremo 3' y la de avance está en el extremo 5'. El ARN colocado entre estas dos señales de replicación puede replicarse. Las regiones líder y de avance contienen los elementos mínimos que actúan in cis para fines de encapsidación mediante la proteína N y para la unión de la polimerasa necesaria para iniciar la transcripción y la replicación.

Para cualquier gen contenido dentro de un genoma de vesiculovirus recombinante, el gen puede estar flanqueado por las señales apropiadas de inicio y terminación de la transcripción que permiten la expresión de esos genes y la producción de productos proteicos codificados. En particular, se usa un polinucleótido heterólogo, que no está codificado por el virus como aislado de la naturaleza o contiene una región codificante en una posición, forma o contexto que no se encuentra de manera natural en un virus.

Un vesiculovirus recombinante para su uso como composición terapéutica o inmunogénica puede, en determinados aspectos, incluir reorganizar el orden génico del virus. En determinados aspectos, el gen N se aleja de la posición proximal del promotor en 3', posición 1. En un aspecto adicional, el gen N se mueve a la posición 2, 3, 4 o 5. En determinados aspectos, el gen N está en la posición 4 en el genoma.

En determinadas realizaciones, el vesiculovirus recombinante comprende un polinucleótido heterólogo. En determinados aspectos, un polinucleótido heterólogo codifica un antígeno. En otros aspectos, el polinucleótido o poligén heterólogo que codifica el antígeno o antígenos inductores de la respuesta inmune heterólogos seleccionados se encuentra en la posición 1, 2, 3, 4, 5 o 6 del orden génico.

A. Producción de vesiculovirus recombinante

La transcripción y replicación de genomas de ARN víricos de cadena negativa, no segmentados y de sentido negativo se logra a través de la actividad enzimática de un complejo proteico multimérico que actúa sobre el núcleo de la ribonucleoproteína (nucleocápside). Las secuencias víricas se reconocen cuando son encapsidadas por la proteína N en la estructura de la nucleocápside. Se reconoce que las secuencias promotoras terminales genómicas y antigenómicas de la estructura de la nucleocápside inician las vías de transcripción o replicación.

Por tanto, se produce un vesiculovirus recombinante atenuado y modificado genéticamente como se describe en el presente documento de acuerdo con procedimientos de rescate conocidos en la materia y, más específicamente, como se describe en los ejemplos a continuación. Se puede usar cualquier virus Isfahan, cepa VSV o serotipo adecuado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, VSV Indiana, VSV Nueva Jersey, VSV Chandipura, VSV Glasgow y similares. Como se ha descrito anteriormente, además de las secuencias polinucleotídicas que codifican formas atenuadas del virus Isfahan o del VSV, la secuencia polinucleotídica también codifica secuencias polinucleotídicas heterólogas o marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican una proteína o proteínas heterólogas seleccionadas.

Las circunstancias normales (aunque no necesariamente exclusivas) para el rescate incluyen una célula de mamífero apropiada en la que la polimerasa T7 está presente en el citoplasma celular para impulsar la transcripción del ARN monocatenario antígenómico (o genómico) del vector de transcripción genómico vírico que contiene ADNc. Ya sea transcripcionalmente conjunta o poco después, esta transcripción de ARN antigénico (o génico) vírico es encapsidada en plantillas funcionales por la nucleoproteína y es activada por los componentes de polimerasa requeridos producidos simultáneamente a partir de plásmidos cotransfectados que expresan las proteínas requeridas que actúan in trans específicas de virus. Estos eventos y procedimientos conducen al requisito previo de la transcripción de ARNm víricos, la replicación y amplificación de nuevos genomas y, por lo tanto, la producción de una nueva progenie de vesiculovirus, es decir, el rescate.

Los vectores de transcripción y expresión son normalmente vectores plasmídicos diseñados para la expresión en la célula huésped. Los vectores de expresión que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas que actúan in trans necesarias para la encapsidación, transcripción y replicación expresan estas proteínas a partir de un vector de expresión o al menos dos vectores diferentes.

Se puede colocar un ADN clonado equivalente de un genoma de vesiculovirus entre un promotor de ARN polimerasa

dependiente de ADN adecuado (*por ejemplo*, el promotor de ARN polimerasa T7) y una secuencia de ribozima auto escindible (*por ejemplo*, la ribozima delta de hepatitis), y se inserta en un vector de transcripción adecuado (por ejemplo, un plásmido bacteriano). Este vector de transcripción proporciona una plantilla de ADN fácilmente manipulable a partir de la cual la ARN polimerasa (por ejemplo, la ARN polimerasa T7) puede transcribir fielmente una copia de ARN monocatenario del ADNc de vesiculovirus con los extremos 5' y 3'. La orientación de la copia de ADNc del virus y el promotor flanqueante y las secuencias de ribozima determinan si se transcriben los ARN antigénicos o génicos equivalentes. También se requieren para el rescate de la nueva progenie de vesiculovirus, las proteínas de soporte que actúan en trans específicas de vesiculovirus necesarias para encapsidar los transcritos de ARN génico o antigénico monocatenarios desnudos en plantillas de nucleocápsides funcionales, y para iniciar la transcripción y replicación vírica: la proteína vírica de la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P) asociada a polimerasa y la proteína polimerasa (L).

En resumen, un procedimiento para generar un vesiculovirus recombinante comprende introducir en una célula huésped un vector de expresión de ADNc vírico que comprende una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento. En determinados aspectos, el vector de expresión comprende un promotor T7 cadena arriba de la posición 1 (P₁), y un sitio de ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV Rz) y una secuencia de terminación T7 cadena abajo de la última posición de una secuencia de ácido nucleico de vesiculovirus recombinante seleccionada. El promotor T7 dirige la síntesis de transcritos de ARN vírico antígenómico a partir del vector de expresión cuando está en presencia de la ARN polimerasa de T7.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además transfectar de manera transitoria una célula huésped con un plásmido que expresa la ARN polimerasa T7. En otras realizaciones, el procedimiento implica además cotransfectar la célula huésped con uno o más plásmidos que expresan al menos las proteínas víricas N, P y L de un vesiculovirus (y opcionalmente M y G). En algunas realizaciones, estas proteínas de vesiculovirus se expresan en la célula huésped usando un sistema de expresión dependiente de ARN polIII. Otras realizaciones incluyen etapas tales como el choque térmico de las células huésped que contienen el vector de expresión, la polimerasa T7 y las proteínas víricas de un vesiculovirus recombinante después de la transfección con ADN plasmídico (ADNp). Las células huésped transfectadas o el sobrenadante obtenido de las células huésped transfectadas pueden transferirse a un cultivo de células de expansión frescas. El vesiculovirus recombinante infeccioso ensamblado puede recuperarse luego del cultivo.

En otros aspectos, un vesiculovirus recombinante competente en replicación puede aislarse y "rescatarse" usando técnicas conocidas en la materia (Ball, L. A. et al. 1999 J. Virol., 73:4705-12; Conzelmann, 1998, Ann. Rev. Genet., 32:123-162; Roberts y Rose, 1998, Virol., 247:1-6). Véase, también, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 8.287.878; 6.168.943; y 6.033.886; y la publicación de patente internacional N.º WO99/02657. Los procedimientos para producir virus de ARN recombinante se denominan en la materia procedimientos de "rescate" o de "genética inversa". Procedimientos ejemplares de rescate para VSV se describen en las patentes de Estados Unidos 6.033.886 y 6.596.529, y la publicación PCT WO 2004/113517.

Las técnicas adicionales para llevar a cabo el rescate de virus tales como VSV se describen en la Patente de Estados Unidos 6.673.572 y la publicación de Estados Unidos número US2006/0153870.

Las células huésped utilizadas en el rescate de los vesiculovirus son aquellas que permiten la expresión de los vectores de los constituyentes necesarios para la producción de vesiculovirus recombinantes. Dichas células huésped pueden seleccionarse de una célula eucariota, tal como una célula de vertebrado. En general, las células huésped proceden de una célula humana, tal como una célula de riñón embrionario humano (por ejemplo, 293). Las células Vero, así como muchos otros tipos de células, también se usan como células huésped como se describe en las patentes de Estados Unidos y la solicitud publicada citada anteriormente. En determinadas realizaciones, se añade un reactivo facilitador de la transfección para aumentar la absorción de ADN por las células. Muchos de estos reactivos son conocidos en la materia (por ejemplo, fosfato de calcio, lípido catiónico LIPO-FECTAMINE® (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y lípido catiónico EFFECTENE® (Qiagen, Hilden, Alemania).

El vesiculovirus rescatado se analiza luego para determinar su fenotipo deseado (morfología de la placa y atenuación de la transcripción y replicación), primero mediante medios *in vitro*. El vesiculovirus también se prueba *in vivo* en un modelo de neurovirulencia animal. Por ejemplo, se establecen modelos de ratón y/o hurón para detectar neurovirulencia. En resumen, grupos de diez ratones son inyectados intracranealmente (IC) con cada uno de un intervalo de concentraciones de virus que abarcan la dosis anticipada de DL₅₀ (una dosis que es letal para el 50 % de los animales). Por ejemplo, las inoculaciones IC que contienen virus a 10², 10³, 10⁴ y 10⁵ ufp se usan donde la DL₅₀ anticipada para el virus está en el intervalo de 10³-10⁴ ufp. Las formulaciones de virus se preparan mediante dilución en serie de reservas de virus purificados en PBS. Luego, los ratones se inyectan a través de la parte superior del cráneo con la dosis requerida, en 25 µl de PBS. Los animales se monitorean diariamente por pérdida de peso, morbilidad y muerte. La DL₅₀ para un vector de virus se calcula luego a partir de la muerte acumulada de ratones en el intervalo de concentraciones analizadas.

Para determinar la inmunogenicidad o antigenicidad mediante la detección de respuestas inmunes humorales, se usan varios inmunoensayos conocidos en la materia, que incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo

competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sandwich", ensayos inmunorradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (utilizando oro coloidal, enzimas o marcadores de radioisótopos, por ejemplo), transferencias Western, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, ensayos de neutralización, etc. En una realización, la unión del anticuerpo se mide mediante la detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la medición de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. En otra realización más para detectar inmunogenicidad, las respuestas mediadas por linfocitos T se analizan mediante procedimientos estándar, *por ejemplo*, ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo*, ensayos de tetrámero, ensayos ELISpot o ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*.

Los términos "aislamiento" o "que aísla" de un vesiculovirus significan el procedimiento de cultivo y purificación de las partículas del virus a partir de restos celulares y similares. Un ejemplo sería tomar el sobrenadante que contiene el virus de un cultivo celular que produce vesiculovirus y pasarlo a través de un filtro de tamaño de poro de 0,1-0,2 micrómetros (por ejemplo, Millex-GS, Millipore) para eliminar los restos celulares. Alternativamente, los viriones se pueden purificar usando un gradiente, tal como un gradiente de sacarosa. Las partículas víricas recombinantes se pueden granular y resuspender en cualquier excipiente o vehículo que se desee. Los títulos pueden determinarse mediante un ensayo de placa estándar o mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos específicos para proteínas particulares.

En determinados aspectos, los vesiculovirus que codifican o contienen uno o más componentes proteicos (proteínas N, P, M, G y/o L) y un polinucleótido heterólogo se han construido con una o más mutaciones o variaciones en comparación con un virus o proteínas víricas de tipo silvestre de manera que el virus tenga propiedades deseables para expresar polinucleótidos heterólogos, a la vez que tiene características que no están presentes en el virus como se aisló originalmente. Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan varios ejemplos de protocolos para implementar procedimientos y composiciones de la invención. Proporcionan antecedentes para generar virus mutantes o variantes mediante el uso tecnología de ácido nucleico o de ADN recombinante.

B. Construcciones del virus Isfahan (ISFV)

El virus Isfahan (ISFV) es un miembro del género *Vesiculovirus* en la familia *Rhabdoviridae*. El ISFV se aisló por primera vez de las moscas de arena en Irán en 1975 (Tesh et al. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1977; 26(2):299-306). El ISFV parece estar geográficamente restringido a Irán y algunos países vecinos, en los que hay evidencia serológica de infección humana (Tesh et al., *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1977, 26(2):299-306; Gaida- movich et al., *Voprosy Virusologii*. 1978, (5):556-60). La infección con ISFV no se ha relacionado con la enfermedad humana y, a diferencia del *Vesiculovirus* prototípico, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el ISFV no parece ciclar en el ganado y/o causar lesiones vesiculares en animales inoculados experimentalmente (Wilks y House, *J Hyg (Lond)*. 1986, 97(2):359-68). El ISFV es morfológicamente similar al VSV (Tesh et al. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene*. 1977; 26(2):299-306) y tiene una organización genómica similar, que incluye secuencias reguladoras de replicación y transcripción altamente conservadas (Marriott, *Arch Virol*. 2005, 150(4):671-80). Sin embargo, ambos virus son serológicamente distintos (Tesh et al. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene*. 1977; 26(2):299-306) y un análisis filogenético de vesiculovirus muestra una divergencia evolutiva sustancial (FIG. 1), basada en una alineación de aminoácidos de las proteínas víricas.

El virus Isfahan comprende un genoma de ARN de cadena negativa no segmentado de aproximadamente 11 kb que codifica cinco proteínas víricas principales abreviadas N, P, M, G y L. La secuencia de nucleótidos del complemento (5' a 3') del genoma vírico Isfahan se proporciona en la SEQ ID NO: 1. El orden genómico de 3' a 5' en el genoma de ARN de sentido negativo codifica proteínas denominadas como nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glucoproteína transmembrana (G) y polimerasa (L), es decir, 3'- N-P-M-G-L-5'. La nucleocápside está implicada en la encapsidación del genoma. Se proporciona una secuencia de aminoácidos de un ejemplo de la proteína N del virus Isfahan como SEQ ID NO: 2. La proteína P es una fosfoproteína implicada en la síntesis de ARN. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de la proteína P del virus Isfahan como SEQ ID NO: 3. La proteína M es una proteína matriz. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de la proteína M del virus Isfahan como SEQ ID NO: 4. La proteína G es una glucoproteína. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de la proteína G del virus Isfahan como SEQ ID NO: 5. La proteína L es una polimerasa grande implicada en la síntesis de ARN. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de la proteína L del virus Isfahan como SEQ ID NO: 6.

La divergencia de ISFV de VSV se puede usar para ayudar a los regímenes terapéuticos y profilácticos mediante (1) el uso de rISFV como un vector en lugar de rVSV, y evitando así el posible vector antiinmunidad con la administración repetida del vector VSV; y (2) la proporción de un segundo vector de Vesiculovirus para constituir un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo con rVSV.

C. Construcciones del virus de la estomatitis vesicular (VSV)

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) comprende un genoma de ARN de cadena negativa no segmentado de aproximadamente 11 kb que codifica cinco proteínas víricas principales abreviadas N, P, M, G y L. Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas G, M, N, P y L del VSV son conocidas en la materia (Rose y Gallione, 1981, J. Virol. 39, 519-28; Gallione et al., 1981 J. Virol. 39:529-35). Se conocen varios serotipos de VSV y se han secuenciado. La secuencia genómica del VSV (Indiana) se proporciona con el número de referencia NC001560 en la base de datos NCBI (véase las SEQ ID NO: 7-12). Otras secuencias para el VSV, incluidas las secuencias VSV (Chandipura), están disponibles en esa base de datos; por ejemplo, véanse los números de referencia Ay382603, Af128868, V01208, V01207, V01206, M16608, M14715, M14720 y J04350, los serotipos VSV, tal como Nueva Jersey, también están disponibles en depósitos como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (véase, por ejemplo, los números de referencia VR-1238 y VR-1239, que se incorporan en el presente documento a partir de la fecha de prioridad de esta solicitud). Otras secuencias y serotipos VSV conocidos se describen en la materia o se mencionan en los documentos citados a lo largo de esta especificación, véase, *por ejemplo*, la solicitud de patente internacional N.º WO2004/093906 y la patente de Estados Unidos N.º 8.287.878.

II. COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

Determinadas realizaciones están dirigidas a composiciones de vesiculovirus recombinantes y procedimientos para inducir una respuesta inmune específica de antígeno a un antígeno cuando se administra a un sujeto mamífero. Una composición inmunogénica útil en esta invención es un virus Isfahan (rISFV) recombinante, atenuado, competente en replicación o un vector que lo codifica. En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica contiene un vesiculovirus recombinante descrito en el presente documento. Determinados aspectos están dirigidos al rISFV como se describe en el presente documento. En un aspecto adicional, un rISFV comprende un polinucleótido heterólogo que codifica uno o más antígenos.

A. Antígenos

En determinadas realizaciones, un vesiculovirus (por ejemplo, rISFV solo, o en un régimen de sensibilización/refuerzo con rVSV) codifica un antígeno heterólogo. Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" o "antígeno dirigido" se refiere a cualquier sustancia, incluidos los antígenos complejos (por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus, etc.) que es capaz de ser la diana de una respuesta inmune. Un antígeno puede ser la diana de, por ejemplo, una respuesta inmune mediada por células y/o humoral de un sujeto administrado o provisto de una composición inmunogénica descrita en el presente documento. El término "antígeno" o "antígeno dirigido" abarca, por ejemplo, la totalidad o parte de antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos específicos de tumor o relacionados con tumor, antígenos parásitos, alérgenos y similares. Un antígeno es capaz de unirse a un receptor de linfocitos T o anticuerpo. Un antígeno además es capaz de inducir una respuesta inmune humoral y/o celular que conduce a la producción de linfocitos B y/o T. El aspecto estructural de un antígeno, por ejemplo, conformación tridimensional o modificación (por ejemplo, fosforilación), que da lugar a una respuesta biológica se denomina en el presente documento "determinante antigénico" o "epítopo". Los determinantes antigénicos o epítomos son aquellas partes de un antígeno que son reconocidas por los anticuerpos, o en el contexto de un MHC, por los receptores de linfocitos T.

Los antígenos víricos incluyen, por ejemplo, antígenos de rabdovirus (por ejemplo, *Lyssavirus*, incluido el virus de la rabia), alfavirus, virus de la hepatitis A, B, C, D y E, VIH, virus del herpes, citomegalovirus, varicela zoster, virus del papiloma, virus de Epstein Barr, virus de paragripe, adenovirus, virus Coxsackie, picornavirus, rotavirus, virus de la viruela, rinovirus, virus de la rubéola, papovavirus, virus de las paperas, virus del sarampión; algunos ejemplos no limitantes de antígenos víricos conocidos incluyen los siguientes: antígenos procedentes de alfavirus tales como proteínas nsP1-nsP4, de la cápside, E3, E2, 6K y E1; de VIH-1 tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev o parte y/o combinaciones de los mismos; antígenos procedentes del virus del herpes humano como el HSV-2 con antígenos tales como el gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD, proteínas tempranas inmediatas tales como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 y ICP0, VP16, US6, US8, UL7, UL19, UL21, UL25, UL46, UL47, UL48, UL49 y UL50, o parte y/o combinaciones de las mismas; antígenos procedentes del citomegalovirus, especialmente citomegalovirus humano tal como gB o derivados del mismo; antígenos procedentes del virus Epstein Barr tales como gp350 o derivados del mismo; antígenos procedentes del virus varicela zoster tales como gpl, 11, 111 e IE63; antígenos procedentes de un virus de la hepatitis tal como el antígeno del virus de la hepatitis B, hepatitis C o hepatitis E (por ejemplo, proteínas env E1 o E2, proteína central, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7, o parte y/o combinaciones de los mismos de HCV); antígenos procedentes del virus del papiloma humano (por ejemplo, proteínas, por ejemplo, L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, o parte y/o combinaciones de los mismos); antígenos procedentes de otros patógenos víricos, tal como el virus sincitial respiratorio (por ejemplo, proteínas F y G o derivados de las mismas), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (por ejemplo, proteínas HA, NP, NA, o M, o parte y/o combinaciones de las mismas).

Los antígenos específicos de tumor, relacionados con tumor o de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. La expresión de dichos antígenos mediante rISFV proporciona tanto la

inducción de una respuesta inmune mediada por células contra la célula cancerosa como la lisis directa de células cancerosas mediante rISFV. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, 5 cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma maligno, cáncer de laringe, cáncer de próstata. Los antígenos del cáncer son antígenos que pueden estimular potencialmente las respuestas inmunes específicas del tumor. Algunos de estos antígenos están codificados, aunque no necesariamente expresados, en células normales. Estos 10 antígenos pueden caracterizarse como los que normalmente son inactivos (es decir, no expresados) en células normales, los que se expresan solo en ciertas etapas de diferenciación y los que se expresan temporalmente, tales como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos cancerosos están codificados por genes celulares mutantes, tales como oncogenes (por ejemplo, oncogén ras activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutante), proteínas de fusión resultantes de supresiones internas o translocaciones cromosómicas. Aun otros antígenos de cáncer están 15 codificados por genes víricos, como los portados en virus tumorales de ARN y ADN. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos específicos de tumor o relacionados con tumor incluyen MART-1/Melan-A, gp100, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA_{bp}, de sus siglas en inglés), ciclofilina b, antígeno colorrectal asociado (CCR) - 0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA, de sus siglas en inglés) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno prostático específico (PSA, de sus siglas en inglés) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, de sus siglas en inglés), receptor de linfocitos T/cadena CD3-zeta, Familia MACE de antígenos tumorales (por ejemplo, 20 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-05), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUG (por ejemplo, MUC-1), HER2/neu, p21ras, RCAS1, alfa-fetoproteína, E-cadherina, alfa-catenina, beta-catenina y gamma-catenina, p120ctn, gp100Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de la poliposis adenomatosa de colon (APC, de sus siglas en inglés), fodrina, Conexina 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos víricos tales como las proteínas del virus del papiloma humano, familia 25 Smd de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2.

En otra realización, se utiliza un rISFV atenuado *per se*, es decir, sin la inclusión de una secuencia polinucleotídica heteróloga, como un agente terapéutico antineoplásico (oncolítico). El ISFV posee propiedades de destrucción de 35 células tumorales *in vitro* e *in vivo*. El término "oncolítico" normalmente se refiere 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 punto en una célula cancerosa, causar la muerte, la lisis o el cese del crecimiento de las células cancerosas y, por lo general, tiene efectos tóxicos mínimos en las células no cancerosas. El rISFV se atenúa utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

40 Los antígenos bacterianos incluyen, por ejemplo, antígenos de micobacterias que causan tuberculosis y lepra, neumococos, bacilos aerobios gramnegativos, *mycoplasma*, staphylococcus, streptococcus, salmonellae, chlamydiae, o neisseriae.

45 Otros antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos de parásitos tales como malaria, leishmaniosis, tripanosomiasis, toxoplasmosis, esquistosomiasis, filariasis, así como antígenos que son alérgenos.

En otro aspecto, el gen G del ISFV puede reemplazarse en su totalidad por una o más de las secuencias polinucleotídicas heterólogas descritas anteriormente. En otro aspecto más, el gen G del ISFV puede reemplazarse 50 por un gen G heterólogo de un segundo vesiculovirus, es decir, seudotipado. En determinados aspectos, un rISFV se puede seudotipar con un gen G del VSV. El gen G del VSV se puede seleccionar entre los serotipos del VSV enumerados anteriormente.

De acuerdo con las variantes de la invención, la composición inmunogénica comprende al menos dos antígenos 55 dirigidos, o una secuencia de nucleótidos heterólogos que codifica al menos dos antígenos dirigidos, o al menos dos secuencias de nucleótidos heterólogos que codifican al menos dos antígenos dirigidos, o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, el antígeno heterólogo es un antígeno de alfavirus. La mayoría de los alfavirus 60 infectan a vertebrados terrestres a través de la transmisión por mosquitos y exhiben un amplio intervalo de huésped (Strauss et al., 1994 Microbiol Rev. 58(3):491-562). Ocasionalmente, estos ciclos se extienden a humanos y animales domésticos para causar enfermedades. Las infecciones en seres humanos con virus del Viejo Mundo como el virus del río Ross, el virus de la chikungunya y el SINV se caracterizan normalmente por fiebre, erupción cutánea y poliartritis, mientras que las infecciones con los virus del Nuevo Mundo, el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), el virus de la encefalitis equina del este (EEEV) y el virus de la encefalitis equina occidental (WEEV, de sus siglas en inglés) pueden causar encefalitis mortal (Strauss et al., 1994 Microbiol Rev. 58(3):491-562). Como 65

consecuencia, los últimos virus se desarrollaron como armas biológicas durante la guerra fría, y las recientes infecciones por aerosoles de primates confirman sus propiedades altamente debilitantes y/o letales (Reed et al., 2007 *The Journal of Infectious Diseases* 196:441-450; Reed et al., 2005 *The Journal of Infectious Diseases* 192:1173-1182; Reed et al., 2004 *The Journal of Infectious Diseases* 189:1013-1017; Smith et al., 2009 Alphaviruses, págs. 1241-1274. En D. D. Richman, R. J. Whitley, y F. G. Hayden (ed.), *Clinical Virology*. ASM Press, Washington, D.C.). El EEEV es uniformemente letal para los macacos cangrejeros después de una alta dosis de infección por aerosoles y causa una de las tasas de mortalidad por causas humanas más altas (> 50 %) de cualquier infección vírica (Reed et al., 2007 *The Journal of Infectious Diseases* 196:441-450). La infección por VEEV en seres humanos no suele ser mortal, pero este virus es uno de los virus más infecciosos por aerosol y es altamente debilitante e inmunosupresor (Reed et al., 2004 *The Journal of Infectious Diseases* 189:1013-1017; Smith et al., 2009 Alphaviruses, págs. 1241-1274. En D. D. Richman, R. J. Whitley, y F. G. Hayden (ed.), *Clinical Virology*. ASM Press, Washington, D.C.; Weaver et al., 2004. *Annu. Rev. Entomol.* 49:141-174). Asimismo, causa una enfermedad endémica extensa en toda América Latina, y su introducción intencional podría provocar la amplificación equina y la transmisión de mosquitos para infectar a cientos de miles de personas. Estos rasgos han dado como resultado la asignación de los alfavirus encefalíticos a la lista de patógenos de categoría B del NIAID.

Debido a que no existen tratamientos antivíricos o composiciones inmunogénicas con licencia para las enfermedades alfavíricas, la población de Estados Unidos sigue siendo vulnerable a un ataque biológico, así como a infecciones naturales con las 3 encefalitis. El desarrollo de un tratamiento antivírico eficaz es particularmente expuesto porque los diagnósticos generalmente ocurren solo después de que las enfermedades prodrómicas han progresado a encefalitis aproximadamente una semana después de la infección. Por lo tanto, la inmunización es el mejor enfoque para proteger contra la enfermedad mortal.

Para abordar esta necesidad insatisfecha, el rISFV se ha modificado para expresar las glucoproteínas E3-E1 de VEEV y EEEV para su uso como composición inmunogénica independiente para ambos alfavirus, y/o para su uso en regímenes de inmunización de sensibilización-refuerzo heterólogos con vectores rVSV que expresan glucoproteínas E3-E1 del VEEV y EEEV, en caso de que dicha modalidad de inmunización sea necesaria para una eficacia óptima.

B. Formulación de vesiculovirus recombinantes

Las composiciones inmunogénicas útiles en esta invención, por ejemplo, el rISFV solo o en un régimen de sensibilización/refuerzo con composiciones del rVSV, comprenden además un diluyente, excipiente o vehículo inmunológicamente o farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Las composiciones inmunogénicas también se pueden mezclar con dichos diluyentes o vehículos de una manera convencional. Tal como se usa en el presente documento, el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros huésped vertebrados. El vehículo apropiado es evidente para los expertos en la materia y dependerá en gran parte de la vía de administración. Por tanto, las composiciones inmunogénicas útiles en esta invención pueden comprender un ISFV recombinante replicable que comprende uno o más de un gen de proteína N, un gen de proteína P, un gen de proteína M, un gen de proteína G y un gen de proteína L; y que comprende además una secuencia polinucleotídica heteróloga, en la que dicha secuencia polinucleotídica heteróloga (a) está flanqueada por una señal de inicio de la transcripción y una señal de parada de la transcripción, y (b) codifica un polipéptido heterólogo; y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Pueden estar presentes componentes adicionales en las composiciones inmunogénicas, incluyendo, pero no se limitan a conservantes, agentes tensioactivos y estabilizadores químicos, agentes de suspensión o dispersantes. Normalmente, los estabilizantes, adyuvantes y conservantes se optimizan para determinar la mejor formulación para la eficacia en el ser humano o animal diana. Los conservantes ejemplares adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etil vainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol.

Los ingredientes estabilizadores adecuados que pueden usarse incluyen, por ejemplo, casaminoácidos, sacarosa, gelatina, fenol rojo, N-Z amina, difosfato monopotásico, lactosa, hidrolizado de lactalbúmina y leche en polvo. Las sustancias tensioactivas adecuadas incluyen, sin limitación, adyuvante incompleto de Freund, análogos de quinona, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de aminoácidos de octadecilo, lisolectina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, metoxihexadecilglicerol y polioles plurónicos; poliaminas, por ejemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, carbopol; péptidos, por ejemplo, péptido y dipéptido de muramil, dimetilglicina, tuftsin; emulsiones de aceite; y geles minerales, *por ejemplo*, fosfato de aluminio, etc. y complejos inmunoestimuladores (ISCOMS). Los rISFV y los rVSV o cualquiera de sus componentes polipeptídicos también pueden incorporarse a los liposomas para su uso como composición inmunogénica. Las composiciones inmunogénicas también pueden contener otros aditivos adecuados para el modo seleccionado de administración de la composición. Las composiciones de la invención también pueden implicar formulaciones liofilizadas, que pueden usarse con otros excipientes farmacéuticamente aceptables para desarrollar formas de dosificación en polvo, líquidas o en suspensión. Véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Vol. 2, 19ª edición (1995), por ejemplo, Capítulo 95 Aerosols; y la publicación de patente internacional N.º WO99/45966.

Estas composiciones inmunogénicas pueden contener aditivos adecuados para la administración a través de cualquier vía de administración convencional. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica de la invención se prepara para administración a sujetos humanos en forma de, por ejemplo, líquidos, polvos, aerosoles, comprimidos, cápsulas, comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico o supositorios. Por tanto, las composiciones inmunogénicas también pueden incluir, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables. En una realización de una formulación para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Otras formulaciones útiles administrables por vía parenteral incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal o como un componente de un sistema polimérico biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero escasamente soluble o una sal escasamente soluble.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento no están limitadas por la selección de los vehículos, adyuvantes u otros ingredientes convencionales fisiológicamente aceptables útiles en las preparaciones farmacéuticas de los tipos descritos anteriormente. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables, a partir de los componentes descritos anteriormente, que tienen una isotonicidad, estabilidad y otras características convencionales de pH apropiadas está dentro de la habilidad de la técnica.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermoclastis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosis necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por los gobiernos de los países en los que se usan las composiciones.

Tal como se usa en el presente documento, "vehículo" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, 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 sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los principios activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

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

Como se ha descrito anteriormente, cualquiera de las realizaciones de los vesiculovirus recombinantes puede usarse en estos procedimientos de tratamiento. Deseablemente, esta composición se mezcla con un diluyente farmacéuticamente aceptable u otros componentes como se describió anteriormente. En una realización, el tratamiento o prevención de una infección causada por un patógeno implica la administración de una o más cantidades eficaces de uno o una combinación de los vesiculovirus recombinantes descritos en el presente documento.

C. Administración del vesiculovirus recombinantes

Las composiciones antigénicas o inmunogénicas de esta invención se administran a un ser humano u otros sujetos mamíferos mediante una variedad de vías que incluyen, aunque no de forma limitativa, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intranasal, oral, sublingual, bucal, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica y transdérmica (véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional N.º WO 98/20734, que se incorpora en el presente documento por referencia). La vía apropiada se selecciona según la naturaleza de la composición inmunogénica utilizada, y una evaluación de la edad, peso, sexo y salud general del paciente y los antígenos presentes en la composición inmunogénica, y factores similares por un médico que lo trate.

En los ejemplos proporcionados a continuación, tanto las composiciones inmunogénicas del rISFV como las composiciones del rVSV se administran por vía intramuscular (i.m.) individualmente o en combinación en un régimen de sensibilización/refuerzo. En otras realizaciones, es deseable administrar las composiciones del rISFV y las composiciones del rVSV por diferentes vías. Por ejemplo, la composición del rISFV puede administrarse por medios convencionales, incluida la administración intramuscular e intranasal. Sin embargo, la selección de dosis y vías de administración no son limitaciones de esta invención.

El orden de administración de la composición inmunogénica y los períodos de tiempo entre administraciones individuales pueden seleccionarse por el médico tratante o un experto en la materia en función de las características físicas y las respuestas precisas del huésped a la aplicación del procedimiento. Se espera que dicha optimización esté dentro de la habilidad de la técnica.

En general, la selección de la "cantidad eficaz" o dosis apropiada para los componentes de la(s) composición(es) inmunogénica(s) de la presente invención también se basará en si la administración es solo del rISFV o sensibilización/refuerzo con una composición del rVSV, así como la condición física del sujeto, más especialmente, incluyendo la salud general, edad y peso del sujeto inmunizado. El procedimiento y las vías de administración y la presencia de componentes adicionales en las composiciones inmunogénicas también pueden afectar las dosis y cantidades de las composiciones de rISFV y rVSV. Dicha selección y ajuste hacia arriba o hacia abajo de la dosis eficaz está dentro de la habilidad de la técnica. La cantidad de rISFV y rVSV requerida para inducir una respuesta inmune, como una respuesta protectora, o para producir un efecto terapéutico en el paciente sin efectos secundarios adversos significativos varía según estos factores.

Se formula una dosis adecuada en una composición farmacéutica, como se describió anteriormente (por ejemplo, se disuelve en aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2 ml de un vehículo fisiológicamente compatible) y se administra mediante cualquier medio adecuado. Los tratamientos pueden incluir varias "dosis unitarias". La dosis unitaria se define como que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad a administrar, y la vía y formulación particulares, están dentro de la habilidad de aquellos en las artes clínicas. No es necesario administrar una dosis unitaria como una inyección única, pero puede comprender una infusión continua durante un período de tiempo establecido. La dosis unitaria de la presente invención puede describirse convenientemente en términos de unidades formadoras de placa (ufp) o partículas víricas para construcciones víricas. Las dosis unitarias varían entre 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} ufp o partículas víricas (pv) infecciosas y más. Alternativamente, dependiendo del virus y el título alcanzable, se suministrará de 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 pv para el paciente o para las células del paciente. Se formula una dosis adecuada en una composición farmacéutica como se describe (por ejemplo, se disuelve en aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2 ml de un vehículo fisiológicamente compatible) y se administra mediante cualquier medio adecuado.

En una realización, las dosis únicas o de refuerzo para rISFV son las mismas. Dichas dosis están generalmente entre 1×10^7 ufp (o medidas como partículas víricas) y 1×10^9 ufp/partículas víricas/ml. Sin embargo, cualquier dosis adecuada se determina fácilmente por los expertos en la materia.

En la segunda realización de los procedimientos descritos en el presente documento, la administración de un vesiculovirus recombinante (por ejemplo, rISFV) está precedida por la administración a un sujeto mamífero de una cantidad eficaz de una composición de sensibilización que comprende un segundo vesiculovirus recombinante (por ejemplo, rVSV) que comprende uno o más marcos de lectura abiertos que codifican los mismos antígenos o heterólogos que los codificados por el primer virus. Alternativamente, la administración del primer virus se sigue por la administración del segundo virus. En cualquier régimen, se puede administrar más de una dosis del primer virus y/o el segundo virus.

De acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, la composición inmunogénica del rVSV puede administrarse al huésped como una composición de refuerzo posterior a la administración de la composición inmunogénica de rISFV de sensibilización que presenta el antígeno o antígenos heterólogos seleccionados. Al sujeto mamífero se le administra una cantidad eficaz de una composición de sensibilización que comprende un rISFV que comprende uno o más marcos de lectura abiertos que codifican una o más proteínas heterólogas bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen su expresión y un diluyente farmacéuticamente aceptable antes de la composición inmunogénica del rVSV. Cuando se usa como composición de sensibilización, esta composición del rISFV se administra una o más de una vez antes de la composición de refuerzo del rVSV.

En otra realización del procedimiento de sensibilización/refuerzo, la composición de sensibilización del rISFV se administra al menos una vez antes de la composición inmunogénica del rVSV, o se administra tanto antes como después de la composición inmunogénica del rVSV.

En otras realizaciones adicionales del régimen de sensibilización/refuerzo, se administran múltiples composiciones del rVSV como refuerzos posteriores. En una realización, se administran al menos dos composiciones del rVSV

después de las composiciones de sensibilización.

Cada composición de vesiculovirus subsiguiente puede tener un serotipo diferente seleccionado de serotipos conocidos y de cualquier serotipo sintético proporcionado mediante la manipulación de la proteína G de vesiculovirus. Por ejemplo, un rVSV puede ser el serotipo Indiana y el otro puede ser el serotipo Chandipura o el serotipo Nueva Jersey. En otra realización, los refuerzos del rVSV adicionales son del mismo serotipo. Cuando se usa como composición de refuerzo, las composiciones del rVSV se administran en serie, después de las composiciones inmunogénicas del rISFV de sensibilización. Los rISFV y los rVSV que muestran un equilibrio deseado de atenuación e inmunogenicidad son útiles en este aspecto.

En otra realización más, la administración de una o más de las composiciones inmunogénicas del rISFV se sigue por una o más administraciones de las composiciones inmunogénicas del rVSV, y luego se sigue por una o más administraciones adicionales de las composiciones inmunogénicas del rISFV.

En otra realización más, la administración de una o más de las composiciones inmunogénicas del rISFV está precedida o seguida por la administración de una o más composiciones inmunogénicas de ADN plasmídico, en donde el ADN plásmido codifica los mismos o diferentes polipéptidos heterólogos como las composiciones inmunogénicas del rISFV.

III. COMPOSICIONES PROTEICAS

Las composiciones proteicas de la invención incluyen partículas víricas y composiciones que incluyen las partículas víricas. En determinadas realizaciones, los vesiculovirus se genomanipularán para incluir variantes de polipéptidos de proteínas víricas N, P, M, G y/o L; y/o polinucleótidos heterólogos. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína" o "polipéptido" se refiere a un polímero de restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones, la totalidad o parte de una proteína o polipéptido vírico está ausente o alterada para hacer que el virus sea más útil para la terapia.

Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" o "proteína variante" o "polipéptido variante" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química o secuencia de aminoácidos está alterada con respecto al tipo silvestre o una proteína o polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido modificado tiene al menos una actividad o función modificada (que reconoce que las proteínas o polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). La actividad o función modificada se puede reducir, disminuir, eliminar, aumentar, mejorar o alterar de alguna otra manera con respecto a esa actividad o función en una proteína o polipéptido de tipo silvestre, o las características del virus que contiene dicho polipéptido. Se contempla que una proteína o polipéptido modificado se pueda alterar con respecto a una actividad o función pero retener aún la actividad o función de tipo silvestre o no alterada en otros aspectos. Alternativamente, una proteína modificada puede ser completamente no funcional o su secuencia de ácido nucleico afin puede haber sido alterada para que el polipéptido ya no se exprese en absoluto, se trunque o exprese una secuencia de aminoácidos diferente como resultado de un cambio de marco u otra modificación.

Se contempla que los polipéptidos pueden modificarse mediante truncamiento, haciéndolos más cortos que su forma inalterada correspondiente o por fusión o combinación de dominios que puede hacer que la proteína alterada sea más larga.

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

Las variantes de delección carecen de uno o más restos de la proteína nativa, inalterada o de tipo silvestre. Se pueden eliminar los restos individuales, o se puede eliminar todo o parte de un dominio (tal como un dominio catalítico o de unión). La cola citoplasmática de la proteína G del vesiculovirus puede truncarse para atenuar el virus. Por ejemplo, la proteína G del rISFV puede tener un truncamiento carboxiterminal de 20 a 25 aminoácidos, mientras que la proteína G del rVSV puede tener un truncamiento carboxiterminal de 20 a 28 aminoácidos. Se puede lograr una mayor atenuación mediante la combinación también el gen N de su primera posición nativa en el genoma del vesiculovirus, o mediante una mutación del gen M no citopático (ncp) en las posiciones de aminoácidos 33 y 51, como se describe en la Patente de Estados Unidos 8.287.878. Se puede introducir un codón de parada (mediante

sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción normalmente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido, un tipo específico de inserto es un polipéptido quimérico que incluye porciones homólogas o similares de una proteína relacionada en lugar de la porción relacionada de una proteína diana. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente uno o más 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 pueden diseñarse 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 reemplaza con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la materia e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a serina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras de modo que se vea afectada una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservadores generalmente implican la sustitución de un resto con uno que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

La expresión "codón funcionalmente equivalente" se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tales como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes. Los codones de aminoácidos incluyen: Alanina (Ala, A) GCA, GCC, GCG, o GCU; Cisteína (Cys, C) UGC o UGU; Ácido aspártico (Asp, D) GAC o GAU; Ácido glutámico (Glu, E) GAA o GAG; Fenilalanina (Phe, F) UUC o UUU; Glicina (Gly, G) GGA, GGC, GGG o GGU; Histidina (His, H) CAC o CAU; Isoleucina (Ile, I) AUA, AUC, o AUU; Lisina (Lys, K) AAA o AAG; Leucina (Leu, L) UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, o CUU; Metionina (Met, M) AUG; Asparagina (Asn, N) AAC o AAU; Prolina (Pro, P) CCA, CCC, CCG, o CCU; Glutamina (Gln, Q) CAA o CAG; Arginina (Arg, R) AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, o CGU; Serina (Ser, S) AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, o UCU; Treonina (Thr, T) ACA, ACC, ACG, o ACU; Valina (Val, V) GUA, GUC, GUG, o GUU; Triptófano (Trp, W) UGG; y Tirosina (Tyr, Y) UAC o UAU.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N o C terminales adicionales, o secuencias en 5' o 3', y aún así ser esencialmente como se establece en el presente documento, incluyendo tener determinada actividad biológica. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes que flanquean las porciones en 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir varias secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que ocurren dentro de los genes.

Lo siguiente es una discusión basada en el cambio de los aminoácidos de una proteína descrita en el presente documento para crear una molécula equivalente, o incluso mejorada. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin una pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas receptoras. Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, determinadas sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en una secuencia de proteínas y en su secuencia polinucleotídica subyacente y, sin embargo, producen una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, los inventores contemplan que se pueden hacer varios cambios en las secuencias de ácido nucleico de vesiculovirus o en un polinucleótido heterólogo codificado sin pérdida apreciable de utilidad o actividad biológica de interés.

Haciendo dichos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica a una proteína se entiende generalmente en la materia (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 materia que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en base a la hidrofilia. La Patente de Estados Unidos 4.554.101, establece que la mayor hidrofilia media local de una proteína, según lo regido por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la Patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácidos: 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 aún producir una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de ± 2, se prefieren particularmente aquellos que están dentro de ± 1, y aquellos dentro de ± 0.5 son aún más particularmente preferidos.

Como se describió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Los expertos en la materia conocen bien ejemplos de sustituciones que tienen en cuenta las diversas características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Haciendo dichos cambios, se puede considerar el análisis filogenético de proteínas relacionadas funcionalmente (véase la Figura 11 y los cuatro cambios de aminoácidos realizados en la proteína N del rISFV, como se representa en el mismo).

IV. MOLECULAS DE ACIDO NUCLEICO

Determinadas realizaciones están dirigidas a composiciones y procedimientos que incluyen polinucleótidos que son capaces de expresar todo o parte de una proteína o polipéptido heterólogo. En algunas realizaciones, todas o partes de un genoma vírico están mutadas o alteradas para generar un virus, polipéptido vírico, polinucleótido heterólogo o polipéptido heterólogo con determinadas propiedades y/o características. Los polinucleótidos pueden codificar un péptido o polipéptido que contiene la totalidad o parte de una secuencia de aminoácidos vírica o heteróloga, o estar genomanipulados para que no codifiquen un polipéptido vírico o codifiquen un polipéptido vírico que tenga al menos una función o actividad añadida, aumentada, reducida o eliminada.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de ARN, ADN o ácido nucleico" aislado se refiere a una molécula de ARN, ADN o ácido nucleico que se ha aislado del ADN genómico total u otros contaminantes. En determinadas realizaciones, el polinucleótido se ha aislado sin otros ácidos nucleicos. Un "genoma de vesiculovirus" o un "genoma de VSV", o un "genoma de ISFV" se refiere a un polinucleótido que puede proporcionarse a una célula huésped para producir una partícula vírica, en presencia o ausencia de un virus auxiliar o regiones codificantes complementarias que suministran otros factores en trans.

La expresión "ADN complementario" o "ADNc" se refiere al ADN preparado usando ARN como plantilla. Puede haber ocasiones en que se prefiera la secuencia genómica total o parcial.

De manera similar, un polinucleótido que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ácido nucleico que incluye secuencias codificantes y, en determinados aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente lejos de otras secuencias codificantes de proteínas o genes de origen natural. A este respecto, el término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una unidad de ácido nucleico que codifica una proteína, polipéptido o péptido (incluidas las secuencias requeridas para la transcripción, modificación postraduccional o localización adecuadas). Como entenderán los expertos en la materia, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos de ácido nucleico genomanipulados más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.

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

Se contempla que las construcciones de ácido nucleico usadas en la presente invención pueden codificar polipéptido(s) de longitud completa de cualquier fuente o codificar una versión truncada o modificada del (de los) polipéptido(s), por ejemplo, un fragmento de péptido heterólogo. Una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia polipeptídica de longitud completa con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo, para permitir la purificación del polipéptido, el transporte, la secreción, la modificación postraduccional o los beneficios terapéuticos tales como el direccionamiento o la eficacia. Se puede añadir un marcador u otro polipéptido heterólogo a una secuencia que codifica el polipéptido. El término "heterólogo" se refiere a un polipéptido, polinucleótido o segmento del mismo que no es el mismo que el polipéptido, polinucleótido modificado, o que 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 incluyen un tramo contiguo de nucleótidos idénticos o complementarios a un segmento vírico particular, tal como un gen N, P, M, G o L del vesiculovirus.

Los segmentos de ácido nucleico usados en la presente invención abarcan ácidos nucleicos modificados que codifican polipéptidos modificados. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia de codones y la equivalencia funcional. Se pueden crear proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que se pueden genomanipular cambios en la estructura de la proteína, en función de las consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios diseñados por seres humanos pueden introducirse mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad o falta de ella. Una proteína se puede

modificar para reducir los efectos de toxicidad de la proteína *in vivo*, o para aumentar la eficacia de cualquier tratamiento que implique a la proteína o un virus que comprenda dicha proteína.

5 Los vectores de vesiculovirus recombinantes pueden manipularse usando una variedad de técnicas que incluyen mutaciones de inserción, mutaciones puntuales, deleciones y barajado de genes.

10 Se puede diseñar un vesiculovirus recombinante para reducir la síntesis de ARNm de N en células infectadas con virus al barajar el gen N (proteína de la nucleocápside) en una posición en el genoma que está más lejos (distal) del promotor de transcripción en 3' nativo. Debido a que el VSV no se considera un patógeno humano, y la inmunidad preexistente al VSV es rara en la población humana, el desarrollo de vectores procedentes del VSV ha sido un foco en áreas tales como composiciones inmunogénicas y terapia génica. Por ejemplo, los estudios han establecido que el VSV puede servir como un vector eficaz para composiciones inmunogénicas, que expresan hemaglutinina del virus de la gripe (Roberts et al., 1999 J. Virol, 73:3723-3732), proteína H del virus del sarampión (Schlereth et al., 2000 J. Virol, 74:4652-57) y las proteínas env y gag del VIH-1 (Rose et al., 2001 Cell, 106:539-549).

15 En determinadas otras realizaciones, la divulgación se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incluyen dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico contigua a la mostrada en las secuencias identificadas en el presente documento.

20 También se entenderá que esta invención no se limita a las secuencias particulares de ácido nucleico y aminoácidos de estas secuencias identificadas. Los vectores recombinantes y los segmentos de ácido nucleico aislados, por lo tanto, pueden incluir diversas regiones codificantes de vesiculovirus, regiones codificantes que tienen alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región codificante básica, o pueden codificar polipéptidos más grandes que, sin embargo, incluyen regiones codificantes de vesiculovirus, o pueden codificar proteínas o péptidos biológicamente
25 funcionales equivalentes que tienen secuencias de aminoácidos variantes.

30 En determinadas realizaciones, el polinucleótido de vesiculovirus y/o un polinucleótido heterólogo puede estar alterado o mutado. Las alteraciones o mutaciones pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones, reorganizaciones, inversiones y similares, y pueden dar como resultado la modulación, activación y/o inactivación de determinadas proteínas o mecanismos moleculares, así como también alterar la función, ubicación o expresión de un producto génico. Cuando se emplea, la mutagénesis de un polinucleótido se puede lograr mediante una variedad de procedimientos mutagénicos estándar (Sambrook et al, 2001). La mutación es el proceso mediante el cual se producen cambios en la función o estructura de un organismo o molécula. La mutación puede implicar la modificación de la secuencia de nucleótidos de un solo gen, bloques de genes o genomas completos. Los cambios
35 en genes individuales pueden ser consecuencia de mutaciones puntuales que implican la eliminación, adición o sustitución de una base de nucleótidos única dentro de una secuencia de ADN, o pueden ser consecuencia de cambios que implican la inserción o eliminación de grandes cantidades de nucleótidos.

40 La mutagénesis insercional se basa en la modificación de un gen mediante la inserción de un nucleótido o fragmento de ácido nucleico conocido. Debido a que implica la inserción de algún tipo de fragmento de ácido nucleico, las mutaciones generadas son generalmente pérdidas de función, en lugar de mutaciones de ganancia de función. Sin embargo, hay ejemplos de inserciones que generan mutaciones de ganancia de función. La mutagénesis insercional se puede lograr utilizando técnicas estándar de biología molecular.

45 La mutagénesis específica de sitio guiada por estructura representa una herramienta poderosa para la disección e ingeniería de interacciones proteína-ligando (Wells, 1996; Braisted et al., 1996). La técnica proporciona la preparación y prueba de variantes de secuencia mediante la introducción de uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en un ADN seleccionado.

50 Tal como se usa en el presente documento, "G-CT" se refiere a un gen G del VSV mutado en el que la proteína G codificada se trunca o se elimina de algunos de los aminoácidos en su dominio citoplasmático (carboxiterminal), también conocida como la "región de la cola citoplasmática" de la proteína G. G-CT1 se trunca de sus últimos 28 aminoácidos carboxilo terminales, lo que da como resultado un producto proteico que retiene solo un aminoácido del dominio citoplasmático de tipo silvestre de veintinueve aminoácidos. Otros truncamientos del gen G se identifican en
55 la Patente de Estados Unidos N.º 8.287.878, por ejemplo, G-CT9, que tiene los últimos veinte restos de aminoácidos carboxiterminales del dominio citoplasmático eliminados, con relación al tipo silvestre. Entre los procedimientos conocidos para alterar la proteína G del rVSV se encuentran las tecnologías descritas en la publicación internacional N.º WO99/32648 y Rose, N. F. et al. 2000 J. Virol., 74:10903-10.

60 El término "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, 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 refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y, posiblemente, la
65 traducción de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden

contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se describen *infra*.

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico a la que se controla el inicio y la velocidad de transcripción. Puede contener elementos génicos que se unen a proteínas y moléculas reguladoras, tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones "posicionado operativamente", "acoplado operativamente", "ligado operativamente", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia. Un promotor puede o no usarse junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

También se puede requerir una señal de inicio específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de traducción heterólogas, incluido el codón de iniciación ATG. La señal de control traduccional y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

En determinadas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios de entrada de ribosomas internos (IRES, de sus siglas en inglés) se usa para crear mensajes multigénicos o policistronicos. Los elementos IRES son capaces de evitar el modelo de escaneo de ribosomas de la traducción dependiente de Cap metilada en 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonnenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonnenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamíferos (Macejak y Sarnow, 1991). En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficaz.

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS, de sus siglas en inglés), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con la tecnología recombinante estándar para digerir el vector. (Véase Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, y Cocea, 1997, "Restriction enzyme digestion" que se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en ubicaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. Un vector puede linealizarse o fragmentarse usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que las secuencias heterólogas se ligen al vector. "Ligadura" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no ser contiguos entre sí.

Los vectores o construcciones pueden comprender al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" se compone de las secuencias de ácido nucleico implicadas en la terminación específica de una transcripción de ARN por una ARN polimerasa. Por tanto, en determinadas realizaciones se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de una transcripción de ARN. Puede ser necesario un terminador *in vivo* para lograr niveles de mensaje deseables. Los terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador de transcripción conocido descrito en el presente documento o conocido por un experto en la materia, que incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, como por ejemplo el terminador de hormona de crecimiento bovino o secuencias de terminación víricas, como por ejemplo el terminador SV40. En determinadas realizaciones, la señal de terminación puede ser una falta de secuencia transcribible o traducible, tal como debido a un truncamiento de secuencia.

Se puede usar una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada de una transcripción. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención. Las realizaciones incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad de la transcripción o puede facilitar el transporte citoplasmático.

En determinadas realizaciones, las células que contienen una construcción de ácido nucleico descrita en el presente documento pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos. Por lo general, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes en función de la implementación de las condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores, incluidos los marcadores que se pueden examinar, tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, se pueden utilizar enzimas detectables tales como la timidina cinasa (tc) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo

emplear marcadores inmunitarios, posiblemente junto con el análisis FACS. No se cree que el marcador utilizado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Los expertos en la materia conocen bien ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y detectables.

5

V. KITS RELACIONADOS CON VESICULOVIRUS RECOMBINANTES

En otra realización más, la presente invención proporciona un kit farmacéutico para la administración rápida de un régimen inmunogénico, profiláctico o terapéutico. Este kit está diseñado para su uso en un procedimiento para inducir un alto nivel de respuesta inmune específica de antígeno en un sujeto mamífero o vertebrado. El kit puede contener al menos una composición inmunogénica que comprende una composición de rISFV como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan múltiples dosis preempaquetadas de la composición inmunogénica de rISFV en el kit para administraciones múltiples. El kit también contiene al menos una composición inmunogénica que comprende una composición de rVSV como se describe en el presente documento. En una realización, se proporcionan múltiples dosis preempaquetadas de la composición inmunogénica de rVSV en el kit para administraciones múltiples.

El kit también contiene instrucciones para usar las composiciones inmunogénicas en un procedimiento de sensibilización/refuerzo como se describe en el presente documento. Los kits también pueden incluir instrucciones para realizar determinados ensayos, diversos vehículos, excipientes, diluyentes, adyuvantes y similares descritos anteriormente, así como aparatos para la administración de las composiciones, tales como jeringas, dispositivos de electroporación, dispositivos de pulverización, etc. Otros componentes pueden incluir guantes desechables, instrucciones de descontaminación, bastones aplicadores o recipientes, entre otras composiciones.

VI. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, así como las figuras, se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos o figuras representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, pueden considerarse modos preferidos para su práctica.

30

Ejemplo 1

ANÁLISIS Y RECUPERACIÓN DEL VIRUS ISFAHAN (ISFV)

35

Se ha desarrollado un sistema para la recuperación del virus Isfahan recombinante (rISFV) del ADN plasmídico que codifica el ADNc genómico de ISFV. La seguridad de rISFV de tipo silvestre (t, de sus siglas en inglés) y la variante atenuada rISFVN4ΔCT25 gag1 se estudió en un modelo de neurovirulencia intracraneal de ratón NIH Swiss Webster de 4-5 semanas de edad altamente sensible. El rISFV tw no modificado exhibió una $DL_{50} > 10^3$ UFP, en contraste con wtVSV_{IN} con una DL_{50} de < 10 UFP. rISFVN4ΔCT25 gag1 exhibió un $DL_{50} > 10^7$, en contraste con rVSV_{IN}N2CT1 con una DL_{50} de 10^4 . Estos resultados indican que el rISFV es fundamentalmente menos patógeno que VSV_{IN} y puede no requerir la utilización de estrategias de atenuación múltiple (N-barajado, truncamiento de la cola citoplasmática de la proteína G) para lograr una seguridad e inmunogenicidad similares a los vectores de rVSV_{IN}.

40

Análisis filogenético de Isfahan. Las secuencias disponibles del género *Vesiculovirus* se descargaron de Gen-Bank. Las secuencias de genes N se alinearon en SeaView (PBIL (Pole Bio-Informatique Lyonnais), Francia) utilizando el algoritmo MUSCLE (Gouy et al., 2010, Molecular Biology and Evolution 27:221-24; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32:1792-97). Las secuencias se alinearon deduciendo secuencias de aminoácidos de marcos de lectura abiertos (ORF) y luego volviendo a secuencias de nucleótidos para análisis posteriores (Gouy et al., 2010, Molecular Biology and Evolution 27:221-24; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32:1792-97). El análisis de máxima verosimilitud (MV) se realizó utilizando el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1989, Cladistics 5, 164-1663). La robustez de la filogenia de MV se evaluó mediante un nuevo muestreo con reemplazamiento de 100 réplicas. El análisis reveló dos grupos principales dentro del género (Figura 1). El primer grupo consiste en VSV_{IN} y sus subtipos, y VSV_{NJ}, mientras que el segundo grupo está compuesto por los virus ISFV, Chandipura y Piry. Estos datos están en congruencia con los análisis serológicos previos para determinar la relación del ISFV dentro del género, y en conjunto indican que el ISFV está relacionado de forma distante con VSV_{IN} (Tesh et al., Am J Trop Med Hyg. 1977, Mar 26(2):299-306).

50

55

Generación de clon de ADNc de Isfahan. Se obtuvo un aislado de ISFV con bajo cultivo de tejido del World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses en la University of Texas Medical Branch. El ARN genómico vírico se aisló de los sobrenadantes de cultivo y se generaron fragmentos de ADNc que abarcaban el genoma completo de ISFV mediante transcripción inversa (TI) y amplificación mediante PCR (RT-PCR) (Figura 2). Los productos de RT-PCR (fragmentos 3-5) se clonaron por etapas en un plásmido que contenía el ADNc genómico de longitud completa del VSV Nueva Jersey (pVSV_{NJ}N4CT1 VIHgag1) (Figura 2). Los fragmentos restantes (1-2) se clonaron en el plásmido pBlueScript (Invitrogen).

65

Los plásmidos de soporte para rescate, que expresan proteínas del ISFV individuales (N, P, M, G y L), se generaron mediante la clonación de los respectivos marcos de lectura abiertos (ORF) en los sitios Nco I y Sac I del plásmido pVSV_{IN} P (Witko et al. J Virol Methods. julio de 2006, 135(1):91-101). Los extremos cohesivos compatibles con Nco I se generaron mediante BspH I (genes N y M), Pci I (gen P) y BsmB I (genes G y L). El gen L de ORF se ensambló mediante la unión de dos fragmentos de ADNc: fragmento n.º 1 (BsmB I a Avr II) y fragmento n.º 2 (Avr II a Sac I). Todos los plásmidos de soporte de rescate resultantes se verificaron mediante análisis de secuencia de nucleótidos.

Construcciones de rISFV y rVSVIN que codifican genes de envoltura de alfavirus. Los genes de envoltura (que abarcan E3-E2-6K-E1) de la cepa FL93 del EEEV y la cepa ZPC738 del VEEV se clonaron en pPBS-ISFV-38 (cuya construcción se describe a continuación). Además, los genes VEEV-ZPC E3-E1 se clonaron en pVSV_{IN} N4CT1 VIHgag5. En cada caso, los genes del alfavirus se insertaron en la quinta posición del genoma del vector usando los sitios de restricción Xho I y Not I de tal manera que los genes insertados están bajo el control de la transcriptasa rISFV o rVSV (Figura 3A). Todos los vectores se verificaron mediante análisis de secuencia de nucleótidos de longitud completa y la expresión de proteínas de alfavirus se confirmó mediante transferencia Western (Figura 3B).

Un gradiente de 3' a 5' en la expresión génica ha sido bien documentado para los vesiculovirus (Ball y White, PNAS. 1976, 73(2):442-6; Villarreal et al., Biochemistry. 1976, 15(8):1663-7) y otros virus de ARN de sentido negativo (Conzelmann, Annual review of genetics. 1998, 32:123-62). Por lo tanto, la expresión máxima de un antígeno diana se logra mediante la inserción del transgén en la primera posición del genoma, inmediatamente adyacente al promotor de transcripción en 3' único fuerte. Sin embargo, los altos niveles de expresión de algunos antígenos pueden ser tóxicos para la replicación del rVSV, lo que lleva a la inestabilidad transgénica y a la pérdida de la expresión del antígeno (no publicado). La regulación a la baja de la expresión de antígenos tóxicos, tales como proteínas Env de VIH-1, al alejar los genes trans más lejos del promotor de la transcripción en 3', ha tenido éxito en mantener la estabilidad genética de la expresión de Env y todos los antígenos diana de un intervalo de diferentes patógenos probados hasta ahora en la plataforma rVSV. Para tener en cuenta la posibilidad de que las glucoproteínas E2/E1 pueden ser tóxicas para la replicación de rVSV y rISFV si se expresan a niveles muy altos, se generaron vectores atenuados de rVSV y rISFV que expresaron E2/E1 desde la quinta posición en el genoma.

Generación de ADNp de virus Isfahan recombinante de longitud completa.

El material de partida para construir el virus Isfahan (ISFV) de longitud completa consistió en dos plásmidos de subclonación que codificaron lo siguiente:

Plásmido UTMB n.º 1 (renombrado pPBS-ISFV-001): Las secuencias de ácido nucleico del promotor T7, líder del VSV, líder del ISFV, N, M, P, G y una secuencia parcial de L insertada en pBlueScript II SK+ a través de los sitios XhoI/KpnI. Las secuencias se insertaron en una dirección de 3' a 5'.

Plásmido UTMB n.º 2 (renombrado pPBS-ISFV-002): Secuencia de ácido nucleico de secuencia parcial en 3' de L del ISFV y terminador insertado en la cadena principal VSV_{NJ} N4CT1 a través de los sitios XhoI/RsrII.

Además de lo anterior, se proporcionaron plásmidos de soporte que codifican genes ISFV individuales (M, P, N, G y L) bajo el control de un promotor T7.

Construcción de pPBS-ISFV-008 que contiene ADNc genómico del ISFV de longitud completa

Inserción de la secuencia eliminada L del ISFV. La secuencia de ácido nucleico ausente de 2,4 kb de L del ISFV se insertó en pPBS-ISFV-001 y pPBS-ISFV-002. El fragmento ausente se generó por PCR usando los cebadores ISF_59- GTGCGT- GGAAGACCGGTACCTCCCATTGG (SEQ ID NO:13)/ ISF_60-TAATGTTATTGCCGCGAATTCGAAACT- GAATAAATC (SEQ ID NO:14) con el plásmido de soporte pT7-IRES-ISFV L como plantilla. El ciclo de PCR utilizado fue: 95 °C, 2 min; (95 °C, desnaturalización de 30 segundos/50 °C, recocido de 30 segundos/72 °C, alargamiento de 2,5 minutos) a 40 ciclos; 72 °C, 2 min. Para garantizar la mayor fidelidad de la secuencia, se usó ADN polimerasa Pfx50 (Invitrogen). A continuación, el producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción KpnI y NgoMIV junto con pPBS-ISFV-001. Este producto de restricción de digestión se ligó para generar pPBS-ISFV-003. El 2,4 kb también se generó mediante PCR usando los cebadores ISF_62-AATAACATTACTC- GAGTTCGGTACCTCCCATTGG (SEQ ID NO:15)/ISF_63-CAACTTTAAATTCGAAACTGAATAAATCTATC (SEQ ID NO:16) con el plásmido de soporte pT7-IRES-L como plantilla e insertado en pPBS-ISFV-002 a través de XhoI y BstBI, respectivamente, para generar pPBS-ISFV-005. El L del ISFV completo se restauró mediante la combinación de pPBS-ISFV-001 y pPBS-ISFV-005 a través de sitios de restricción XhoI/KpnI para generar pPBS-ISFV-006.

Construcción del promotor T7 adyacente a la líder del ISFV. Para generar una construcción adecuada para el rescate del ISFV, el promotor T7 (TAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO: 17)) tuvo que colocarse inmediatamente cadena arriba de la secuencia líder del ISFV (ACGGAGAAAAACAAACCAATTCACGC (SEQ ID NO: 18)). Por lo tanto, la amplificación por PCR del promotor T7 adyacente a la secuencia líder del ISFV se logró usando los cebadores ISF_65- TTGAGCACCTGGTACAGG- TATGAATTGATGTGACAC (SEQ ID NO:19)/ ISF_66-GCGTGAATTGGTTTGTCTCCGTCCTATAGTGAGTCG- TATTAGCCGGCCTCGAGT AAATTAATT (SEQ ID

NO:20) con pPBS-ISFV-001 como plantilla. La amplificación por PCR resultante generó un fragmento que sirvió como plantilla para una segunda ronda de amplificación utilizando los cebadores ISF_65-TTGAGCACCTGGTACAGGTATGAATTGATGTGACAC (SEQ ID NO:21)/ISF_67- CGTATTAGCCGGCCTCGAG-TAAATTAATT (SEQ ID NO:22) para crear los sitios de restricción EcoNI/NgoMIV. El producto de PCR se insertó luego en pPBS-ISFV-001 a través de los sitios de restricción EcoNI/NgoMIV para generar pPBS-ISFV-007.

Construcción de un ADNp que contiene un ADNc del virus Isfahan de longitud completa. Se generó un ADNp que contenía ADNc genómico del ISFV de longitud completa mediante la digestión de pPBS-ISFV-006 y pPBS-ISFV-007 con las enzimas de restricción NgoMIV/SanDI para construir pPBS-ISFV-008 con la secuencia de ácido nucleico 5'-N₁-P₂-M₃-G₄-L₅-3' y el promotor T7 adyacente a la secuencia líder de ISFV.

Procedimiento de rescate del rISFV

Preparación de ADNp. Para cada electroporación, los siguientes ADN plasmídicos como se enumeran en la Tabla 1 se combinaron en un tubo de microcentrifuga en condiciones estériles:

Tabla 1	
Plásmidos *	Cantidades **
pCMV-Neo-T7	50 µg
pT7-IRES-ISFV-N	10 µg
pT7-IRES-ISFV-P	4 µg
pT7-IRES-ISFV-L	1 µg
pT7-IRES-ISFV-M	1 µg
pT7-IRES-ISFV-G	2 µg
genoma completo de pPBS-ISFV	12 µg
* Todas las proteínas víricas se expresaron a partir de secuencias de nucleótidos de tipo silvestre y la transcripción estaba bajo control de un promotor T7	
** Las cantidades de ADNp se calculan para una electroporación.	

El volumen de ADN se ajustó a 300 µl con agua estéril, libre de nucleasas. A continuación, se añadieron 60 µl de acetato sódico 3 M y 900 µl de etanol al 100 % y la mezcla se almacenó durante la noche a -20 °C. El ADN se sedimentó mediante centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y el sedimento de ADN se secó al aire y se resuspendió en 50 µl de agua estéril, libre de nucleasas para cada electroporación.

Preparación de células Vero. Los siguientes medios enumerados en la Tabla 2 se usaron para el rescate de ISFV:

Tabla 2	
Medio de rescate n.º 1	Medio de rescate n.º 2
Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)	Medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM)
Suero bovino fetal (FBS) al 10 %	DMSO al 1 %
β-mercaptoetanol 0,22 mM	β-mercaptoetanol 0,22 mM
Aminoácidos no esenciales al 1 %	Aminoácidos no esenciales al 1 %
piruvato de sodio al 1 %	piruvato de sodio al 1 %

Cada electroporación requiere células de aproximadamente 1,3 matraces T-150 casi confluentes o un matraz confluyente. Las monocapas celulares de cada matraz T150 se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin Ca²⁺ o Mg²⁺. Se aspiró la DPBS y se tripsinizó con 5 ml de solución de tripsina-EDTA, y luego se incubó a 37 °C durante hasta 5 minutos. Después de desalojar las células mediante pulsación del matraz, se añadieron 10 ml de Medio de rescate 1 a cada matraz para suspender las células y se transfirieron 2 matraces a un tubo cónico de 50 ml que contenía 10 ml de Medio de rescate 1. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron con 10 ml de medio de rescate 2 por tubo cónico de 50 ml, seguido de centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El lavado se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 0,7 ml de medio de rescate 2. La suspensión celular se transfirió a un tubo de microcentrifuga alicuotado con 50 µl de la solución de ADN plasmídico y se mezcló suavemente, seguido de la transferencia de las células/ADN a una cubeta de electroporación.

Electroporación. Las células se electroporaron en un electroporador BTX820 como sigue:

Modo:	Baja tensión
Voltaje:	140 V
Cantidad de pulsos:	4

(continuación)

Modo:	Baja tensión
Longitud del pulso:	70 ms
Intervalos del pulso:	500 ms

Después de la electroporación, todas las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se añadió 1 ml de medio de rescate 1 a la cubeta con una mezcla suave para resuspender las células electroporadas. La suspensión celular se transfirió luego de la cubeta a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía 10 ml de medio de rescate 1 y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El medio se aspiró y las células se resuspendieron en 10 ml de medio de rescate 1 y se transfirieron a matraces T-150 que contenían 20 ml de medio de rescate 1. Los matraces se incubaron a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante 3 horas, seguido de un choque térmico a 43 °C (CO₂ al 5 %) durante 3-5 horas y luego se volvieron a 32 °C para una incubación a largo plazo. Después de una noche de incubación, el sobrenadante se reemplazó con 25 ml de Medio de rescate 1 nuevo. Los rescates positivos del rISFV mostraron un efecto citopático (CPE, de sus siglas en inglés), caracterizado por regiones de células redondeadas, después de 5-10 días. Se recogió el sobrenadante de rescate; congelado instantáneamente en un baño de etanol/hielo seco y se aisló un solo clon(es) de virus mediante selección de placa seguido de dos rondas de amplificación en células Vero para generar una reserva de trabajo de virus.

15 Alineación de aminoácidos de la nucleoproteína del ISFV/Vesiculovirus

La secuencia de aminoácidos de la nucleoproteína del ISFV se alineó con otras secuencias de nucleoproteína del vesiculovirus (Tabla 3). Las coincidencias porcentuales se basan en identidades de aminoácidos con la secuencia de nucleoproteína del ISFV. La homología detallada en las secuencias se puede ver en la Figura 4. Las regiones de homología de aminoácidos están sombreadas.

Tabla 3

Secuencia de nucleoproteína de	% de coincidencia en comparación con ISFV
Serotipo del VSV Indiana	51
Serotipo del VSV NJ	51
Chandipura	58
Piry	60
Cocal	50
Alagoas	51
Viremia de primavera del virus de la carpa	43
vesículo_Pike Fry	45

Ejemplo 2

25 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RISFV ATENUADOS MEDIANTE BARAJADO DE GENES Y TRUNCACIONES DE LA COLA CITOPLÁSMICA DE G DEL ISFV

30 *Construcción de rISFV-N4G5-MCS1.* El plásmido pPBS-ISFV-008 comprende la secuencia de ácido nucleico 5'- N₁-P₂-M₃-G₄-L₅-3' [antigenoma de rISFV]. Los números de subíndice indican la posición genómica de cada gen ISFV, P (que codifica la fosfoproteína), M (que codifica la proteína de la matriz), G (que codifica la proteína de unión), N (que codifica la proteína nucleocápside) y L (que codifica la proteína polimerasa).

35 El plásmido pPBS-ISFV-009 comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-MCS₁-N₂-P₃-M₄-G₅-L₆-3' (antigenoma de un rISFV con un casete transcripcional adicional en la posición 1). De acuerdo con esta fórmula, el MCS (sitio de clonación múltiple) es una unidad transcripcional (UT) vacía en el rISFV antigénico en la posición 1 inmediatamente cadena arriba de N del ISFV. Los números de subíndice indican la posición antigénica de cada gen ISFV, P (que codifica la fosfoproteína), M (que codifica la proteína de la matriz), G (que codifica la proteína de unión), N (que codifica la proteína nucleocápside) y L (que codifica la proteína polimerasa).

40 Primero, se eliminó el sitio NheI interno en ISFV L para fines de clonación: Se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF_68 - AATCTGGAcgctctcGCTAGtCAGGCTGATTATTTGAGG (SEQ ID NO:23) / ISF_48 - TTGATATTTCCCAACTCTAC (SEQ ID NO:24) y usando pPBS-ISFV-008 como plantilla y se insertó en pPBS-ISFV-008 a través de los sitios de restricción Afel/BsmBI y Afel/NheI, respectivamente, para generar pPBS-ISFV-45 010.

50 Se generó un segundo fragmento de PCR que contiene una secuencia parcial de ISFV M - ISFV G - ISFV L parcial con los cebadores ISF_73- CGCATGCCGTCTCCTTATGTTGATTG (SEQ ID NO:25) / ISF28 - AGCATTCATTATAAGTATGAC (SEQ ID NO:26) y usando pPBS-ISFV-008 como plantilla. Este fragmento se insertó en un vector de clonación pT7Blue modificado (Novagen) a través de los sitios de restricción SphI/AgeI para generar

pPBS-ISFV-011.

A partir de PPBs-ISFV-011, dos reacciones de mutagénesis consecutivas se realizaron usando pares de cebadores ISF_71 - GCTTTTCACAGATGAAGCTAGCTGAAAGTATGAAAAAACG (SEQ ID NO:27) / ISF_72 - GTTTTTTCATACTTTCAGCTAGCTTCATCTGTGAAAAGCTTG (SEQ ID NO:28) and ISF_69 - AACAGAGGTCAAACGCGTGTCAAATGACTTCAGTTTTATTCATG (SEQ ID NO:29) / ISF_70 - GAATAAAACTGAAGTCATTTTGACACGCGTTTGACCTCTGTTAAT (SEQ ID NO:30) para generar pPBS-ISFV-013. Luego se digirió pPBS-ISFV-013 usando enzimas de restricción BsmBI/Agel y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-009. La construcción resultante pPBS-ISFV-014 comprendía, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-MCS₁-N₂-P₃-M₄-G₅-L₆-3', pero a diferencia de pPBS-ISFV-009, el gen G del ISFV está flanqueado por los sitio de restricción MluI/NheI que permiten el intercambio fácil con variantes de G del ISFV que comprenden, por ejemplo, truncamientos de la cola citoplasmática de G del ISFV.

Para barajar el gen N en la posición 4 y, por lo tanto, para atenuar rISFV como un vector, se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF_84 - CAGCTGGCGGCCGCTAGGAATTCAAATCAACATATATGAAAAAATCAACAGAGATACAACATG (SEQ ID NO:31) / ISF20 - ACATAGTGGCATTGTGAACAG (SEQ ID NO:32) y usando pPBS-ISFV-008 como plantilla y se insertó en un vector de clonación pT7Blue modificado (Novagen) a través de los sitios de restricción HindIII/NotI para generar pPBS-ISFV-017. pPBS-ISFV-017 y pPBS-ISFV-014 se combinaron mediante el intercambio del inserto BsmBI/NotI de pPBS-ISFV-017 en el fragmento de vector correspondiente de pPBS-ISFV-014 para generar pPBS-ISFV-019.

Al mismo tiempo, se generó pPBS-ISFV-015 mediante amplificación por PCR de un fragmento con cebadores ISF_73- CGCATGCCGTCTCCTTATGTTGATTG (SEQ ID NO:33) / ISF_82 - AGTCATACCGGTCTCGTTAATTTTTTTCAT- ATCTTTCTTCTGCATGTTATAATTC (SEQ ID NO:34) y usando pPBS-ISFV-008 como plantilla e insertándolo en un vector de clonación pT7Blue modificado (Novagen) a través de los sitios de restricción SphI/Agel. Se generó un segundo fragmento por PCR con ISF_80 - TCGAGAACGCGTTTGACCTCTGTTAATTTTTTTCATATATGTTGATTTGAATTC (SEQ ID NO:35) / ISF_81 - ATTCCAACGCGTCTCGTTAACAGGGATCAAATGACTTCTGTAGTAAAG (SEQ ID NO:36) y usando pPBS-ISFV-008 como plantilla e insertado en pPBS-ISFV-015 a través de los sitios de restricción BsmBI/MluI y BsaI/MluI, respectivamente, para generar pPBS-ISFV-016.

Finalmente, pPBS-ISFV-016 y pPBS-ISFV-019 se combinaron mediante el intercambio del inserto BsmBI/MluI de pPBS-ISFV-016 en el fragmento de vector correspondiente de pPBS-ISFV-019. La construcción resultante pPBS-ISFV-020 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-MCS₁-P₂-M₃-N₄-G₅-L₆-3', en la que el gen N se ha barajado en la posición 4 del rISFV en comparación con pPBS-ISFV-014.

Construcción de rISFV-N4G3-MCS5. A partir de PPBs-ISFV-013, una reacción de mutagénesis se realizó con cebadores ISF_90 - GCTTTTCACAGATGAAGCTAGCGCATGCGGCCGCTGAAAGTATGAAAAAACG (SEQ ID NO:37) / ISF_91 - GTTTTTTCATACTTTCAGCGGCCGCGCATGCGCTAGCTTCATCTGTGAAAAGCTTG (SEQ ID NO:38) para generar pPBS-ISFV-022. Un enlazador de oligonucleótidos generados a partir de ISF_92 CTAGCTGAAAGTATGAAAAAATTAACAGAGGTCAAACCTCGAGGATATCGGTACCG AAGGCGCGCCAGCTGTGCGGCC (SEQ ID NO:39) and ISF_93 - GGCCGCACAGCTGGCGCGCCTTCGGTACCGATATCCTCGAGTTTGAC- CTCTGTTAA TTTTTTTCATACTTTCAG (SEQ ID NO:40) se ligó entonces con el fragmento del vector NheI/NotI de PPBs-ISFV-022 para generar pPBS-ISFV-023. Un fragmento de PCR se generó con cebadores ISF_98 - GAATTCCTCGAGTTGACCTCTGTTAATTTTTTTCATATATGTTGATTTGAATTC (SEQ ID NO:41) y ISF_99 - GATGAA GCTAGCTGAAAGTATGAAAAAATTAACAGGGATCAAATGACTTCTGTAG (SEQ ID NO:42) y usando pPBS-ISFV-016 como plantilla e insertado en pPBS-ISFV-023 a través de los sitios de restricción XhoI/NheI para generar pPBS-ISFV-024.

Además, se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF16 - ATCATTCTTTTATTTGTCAGC (SEQ ID NO:43) and ISF_100 - TATATGGCTAGC GAAGACAGAGGGATCAAATGTCTCGACTCAACCAAT (SEQ ID NO:44) y usando pPBS-ISFV-017 como plantilla e insertado en pPBS-ISFV-017 a través de los sitios de restricción BsmBI/NheI para generar pPBS-ISFV-025.

Dos enlazadores de oligonucleótidos generados a partir de ISF_101 - CTAGCCCGGCTAATACGACTCACTATAGGACGGA- GAAAAACAAA (SEQ ID NO:45) / ISF_102 - TTGGTTTGTCTTCTCCGTCCTATAGTGAGTCGTATTAGCCGGCG (SEQ ID NO:46) y ISF_103 - CCAATTCACGCATTAGAAGATTCCAGAGGAAAGTGCTAAC (SEQ ID NO:47) / ISF_104 - CCCTGTTAGCACTTCTCTGGAATCTTCTAATGCGTGAA (SEQ ID NO:48), respectivamente, se ligaron luego con el fragmento del vector NheI/BbsI de pPBS-ISFV-025 (para generar pPBS-ISFV-026). Para generar pPBS-ISFV-030, se digirió un plásmido que comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-P₁-M₂-N₃-G₄-L₅-3', pPBS-ISFV-026 usando enzimas de restricción BsmBI/Ngo-MIV y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-020.

Finalmente, pPBS-ISFV-024 y pPBS-ISFV-030 se combinaron mediante el intercambio del inserto BsmBI/Agel de

pPBS-ISFV-024 en el fragmento de vector correspondiente de pPBS-ISFV-030. La construcción resultante pPBS-ISFV-031 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-P₁-M₂-G₃-N₄-MCS₅-L₆-3', en la que el gen N se ha barajado en la posición 4 del rISFV en comparación con pPBS-ISFV-014.

5 *Construcción de rISFV-N*4G5-MCS1.* Aunque una alineación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas N de rISFV y rVSV reveló solo una homología general del 52 %, la alineación demostró una homología muy cercana para un epítipo restringido H2d fuerte y conocido (MPYLIDFGL; véase la Figura 11). Por lo tanto, se usaron alineaciones adicionales con proteínas N adicionales de otros vesiculovirus para eliminar o al menos reducir la homología entre rISFV y rVSV para este tramo de aminoácidos. A partir de pPBS-ISFV-016, una reacción de mutagénesis se realizó con los cebadores ISF_127 -GAAAGACAAGAAGTGGACCAGAGCGATTCTACATGCCTTACATGATTGATATGGG
10 GATCTCAACCAAATC (SEQ ID NO:49) / ISF_128 -
GGTTGAGATCCCCATATCAATCATGTAAGGCATGTAGGAATCGCTCTGGTCCACTTC TT- GTCTTTCTTTTC (SEQ ID NO:50) para generar pPBS-ISFV-033 que contiene los siguientes cambios de aminoácidos en N del ISFV: K271Q, A272S, L279M, F282M (ISFV N*) (véase la Figura 11). El pPBS-ISFV-033 se digirió usando las enzimas de restricción SandI/BsrGI y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-024 para generar pPBS-ISFV-037. Finalmente, pPBS-ISFV-037 y pPBS-ISFV-031 se combinaron mediante el intercambio del inserto NheI/Agel de pPBS-ISFV-037 en el fragmento de vector correspondiente de pPBS-ISFV-031. La construcción resultante pPBS-ISFV-038 comprende, por lo tanto, como pPBS-ISFV-031, la secuencia de ácido nucleico antígeno 5'-P₁-M₂-G₃-N₄-MCS₅-L₆-3', sin embargo, la proteína N del ISFV codificada transporta los
15 20 cuatro cambios de aminoácidos K271Q, A272S, L279M, F282M (ISFV N*).

Vectores atenuados de rISFV N que expresan el antígeno modelo gag SDE del VIH-1. El plásmido pPBS-VIH-055 es un vector de clonación estándar que comprende un gen gag del VIH-1 truncado llamado gag SDE de VIH-1 (epítipo dominante único). La secuencia de aminoácidos de gag SDE del VIH-1 es la siguiente:
25 ¹MVARASVLGGELDRWEKEEERPGGKKKYKLKEEWEASRELERFAVNPGLTSEGCRQ ⁶⁰I-
¹⁹²GGHQAAMQMLKETINEEA²¹⁰A³³³ILKALGPAATLEEMMTACQGVGGYPYDVPDYAPGHKARV³⁶³L (SEQ ID NO:51) Los números indican las posiciones de aminoácidos en la proteína gag del VIH-1 nativa. Se encontró que el péptido "AMQMLKETI" (SEQ ID NO: 52) es un inductor fuerte de una respuesta de linfocitos T en ratones BALB/c y, por lo tanto, se usó gag SDE del VIH-1 como prueba de antígeno modelo de inmunogenicidad de diferentes diseños de vectores.
30

Primero, se digirió pPBS-VIH-055 usando las enzimas de restricción XhoI/NotI y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-014. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-013 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(H IV-1 gag SDE)₁-N₂-P₃-M₄-G₅-L₆-3' y se usó para
35 crear el rISFV correspondiente.

El plásmido pPBS-VIH-055 se digirió usando las enzimas de restricción XhoI/NotI y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-020. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-014 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-P₂-M₃-N₄-G₅-L₆-3'. Por lo tanto, el virus rISFV correspondiente comprende un único marcador de atenuación: un ISFV N barajado en la posición 4 del rISFV.
40

Se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF_83 - TTTTTGCTAGCTTCACCTGCATAATAGTGGCAAC (SEQ ID NO:53) / ISF_69 - AACAGAGGTCAAACGCGTGTCAAATGACTTCAGTTTTATTTCATG (SEQ ID NO:54) y usando pPBS-ISFV-VIH-014 como plantilla y se insertó en pPBS-ISFV-VIH-014 a través de MluI/NheI para generar pPBS-ISFV-VIH-015, que ahora comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-P₂-M₃-N₄-(GACT25)₅-L₆-3'. Por lo tanto, el virus rISFV correspondiente comprende dos marcadores de atenuación: (1) el barajado de N del ISFV en la posición 4 del rISFV antigénico y (2) el truncamiento del extremo distal de la cola citoplasmática (CC) de G del ISFV mediante 25 aminoácidos. La longitud precisa de los dominios CC y transmembrana (TM) de la proteína G del ISFV no se ha caracterizado tan bien como los de VSV_{IN}, pero se predice un dominio hidrófobo aproximado de 18 aminoácidos (aa) cerca del extremo carboxilo como el anclaje TM de la proteína G del ISFV. Los restantes 33 restos de cadena abajo representan la CC de la proteína G.
50

Además, pPBS-ISFV-033 se digirió usando las enzimas de restricción BsmBI/MluI y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-VIH-015. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-018 comprendía, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-P₂-M₃-N₄-(GACT25)₅-L₆-3'. En comparación con rISFV-VIH-015, el gen N del ISFV codificado en el rISFV-VIH-003 correspondiente llevaba los cuatro cambios de aminoácidos K271Q, A272S, L279M, F282M dentro del epítipo de linfocitos T fuerte conocido para ratones BALB/c.
55 60

El plásmido pPBS-ISFV-VIH-015 se digirió usando las enzimas de restricción MluI/NheI y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-VIH-013. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-017 comprendía, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-N₂-P₃-M₄-(GACT25)₅-L₆-3'. Por lo tanto, el virus rISFV correspondiente comprende un único marcador de atenuación: el truncamiento de la cola citoplasmática de G del ISFV.
65

Finalmente, se generó un vector rISFV atenuado en el que el gen truncado ISFV GΔCT25 fue reemplazado por el gen VSV_{NJ} GCT1, que codificó una G del VSV modificada del serotipo NJ con truncamiento similar en la cola citoplasmática de 28 aminoácidos. Para generar pPBS-ISFV-VIH-016 [que comprende la secuencia de nucleótidos 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-P₂-M₃-N₄-(VSV_{NJ} GCT1)₅-L₆-3'], pPBS-VSV-VIH-054 (vector de clonación del rVSV que contiene un gen VSV_{NJ} GCT1 flanqueado por los sitios de enzimas de restricción MluI/NheI) se digirió usando las enzimas de restricción MluI/NheI. El inserto aislado se ligó luego con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-VIH-015. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-016 comprendía, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-N₂-P₃-M₄-(VSV_{NJ} G CT1)₅-L₆-3' y se usó para rescatar el correspondiente rISFV.

La atenuación de todos los rISFV que expresan gag SDE del VIH-1 se probó *in vitro* mediante ensayo en placa. Los tamaños de placa observados fueron los siguientes (Figura 5): rISFV-VIH-013 = rISFV-VIH-14 > rISFV-VIH-15 = rISFV-VIH-017 ≥ rISFV-VIH- 018 = rISFV-VIH-016.

Además de las construcciones de rISFV descritas anteriormente, se usaron dos vectores de rVSV atenuados generados a partir de los siguientes plásmidos en los experimentos de inmunización de sensibilización/refuerzo:

pPBS-VSV-VIH-106 comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-P₂-M₃-N₄-(G CT1)₅-L₆-3' y todos los genes del vector (P, M, N, G CT1 y L) proceden del serotipo VSV Indiana. El rVSV_{IN} procedente de este plásmido se usó en el estudio representado en la Figura 16.

pPBS-VSV-VIH-122 comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-P₂-M₃-N₄-(G CT1)₅-L₆-3', genes del vector (P, M, N y L) procedentes del serotipo VSV Indiana, y el gen del vector G CT1 procede del serotipo VSV NJ. El rVSV_{NJ} procedente de este plásmido se usó en el estudio representado en la Figura 16.

Estabilización del truncamiento de la cola citoplasmática de G del ISFV. Numerosos rISFV atenuados que comprenden un gen ISFV GΔCT25 (por ejemplo, rISFV-VIH-015 y rISFV-VIH-018) se pasaron ampliamente en cultivo de células Vero para determinar la estabilidad de este marcador de atenuación. En el paso 10, prácticamente todos los rISFV extendieron la cola citoplasmática por dos aminoácidos para contener esencialmente un gen rISFV GΔCT23. De este modo, los rISFV probados cambiaron el codón de parada del gen ISFV GΔCT25 en un codón para un aminoácido y luego usaron una alternativa en el codón de parada dos codones cadena abajo. Por lo tanto, se examinaron dos manipulaciones de la unión del gen ISFV GΔCT25 - L por su capacidad para estabilizar el marcador de atenuación ISFV GΔCT25 en rISFV:

A) Combinando la señal de parada transcripcional (subrayado) y traduccional (negrita) para el casete transcripcional que contiene ISFV GΔCT25:

```
...gtgcgatga aaaaaaacgaa tcaacagagt tcatcatgga tgagtactct gaagaaaagt ggggcgattc...
...cacgcatact ttttttgctt agttgtctca agtagtacct actcatgaga cttcttttca ccccgctaag...
>.....>> ISF G deltaCT25 (SEQ ID NO:55)
```

```
l c v -
>>.....ISF L.....>
(SEQ ID NO:56) m d e y s e e k w g d
```

B) Usando el 3'-NCR de VSV_{IN} G CT1 presente en vectores prototípicos rVSV_{IN}-N4CT1 como 3'-NCR para el casete de expresión ISFV GΔCT25:

```

NheI
-+----
... gtgcaggtga gctagccgcc tagccagatt cttcatgttt ggaccaaate aacttgtgat accatgctca
cacgtccact cgatcggcgg atcggctctaa gaagtacaaa cctggtttag ttgaacacta tggtagcagt
>.....>> ISF G CTdelta25
l c r -
```

```
... aagaggcctc aattatattt gagtttttaa tttttatgaa aaaaacgaat caacagagtt catcatggat
ttctccggag ttaatataaa ctcaaaaatt aaaaatactt tttttgctta gttgtctcaa gtagtaccta
ISF L >>....>
m d
(SEQ ID NO:57)
```

Los resultados mostraron que solo el enfoque (B) estabilizó el marcador de atenuación ISFV GΔCT25 durante el paso extenso de los virus rISFV correspondientes (por ejemplo, rISF-VIH-020) en cultivo de células Vero.

Enfoque A - Construcción

- 5 Para manipular la unión del gen ISFV GΔCT25 - L, se digirió pPBS-ISFV-VIH-018 usando las enzimas de restricción MluI/NheI y se insertó en un fragmento de vector correspondiente procedente de un vector de clonación pT7Blue modificado (Novagen) para generar pPBS-ISFV-049.
- 10 Primero, una reacción de mutagénesis se realizó en pPBS-ISFV-049 con los cebadores ISF_140 - CTATTATGCGTATGCGAGACGCGTCTCGTATGAAAAAACGAATCAACAGAG (SEQ ID NO:58) / ISF_141 - CTGTTGATTCTGTTTTTTCATACGAGACGCGTCTCGCATACGCATAATAGTG (SEQ ID NO:59) para generar pPBS- ISFV-051. Además, se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF_146 - AATTAACGTCTC AGAGATTGCAGCGAACCCAGTGC GGCTGCTGTTTTCTTTC (SEQ ID NO:60) / ISF_69 - AACAGAGGTCAAACGCGTGTCAA AATGACTTCAGTTTTATTCATG (SEQ ID NO:61) y usando pPBS-ISFV-031 como plantilla. Junto con un enlazador de oligonucleótidos generados a partir de ISF_144 - TCTCTGTGATCCTGATCATCGGACTGAT- GAGGCTGCTGCCACTACTGTGCAGGTGAG (SEQ ID NO:62) y ISF_145 -CTAGCTCACCTGCACAGTAGTGGCAGCAGCCTCATCAGTCCGATGATCAGGATCACA (SEQ ID NO:63), el fragmento de PCR (MluI/BsmBI) se insertó en pPBS-ISFV-049 a través de MluI/NheI para generar pPBS- ISFV-056. En comparación con pPBS-ISFV-049, la secuencia de nucleótidos que codifica la región transmembrana de ISFV GΔCT25 en pPBS-ISFV-056 se ha modificado silenciosamente para reducir la riqueza de A/T. Se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF_147 - CTAG- GCGCGTCTCGCATACGCACAGTAGTGGCAG (SEQ ID NO:64) / ISF_69 - AACAGAGGTCAAACGCGTGTCAA AAT- GACTTCAGTTTTATTCATG (SEQ ID NO:65) y usando pPBS-ISFV-056 como plantilla e insertado en pPBS-ISFV-051 a través de MluI/BsmBI para generar pPBS-ISFV-059.
- 25 El plásmido pPBS-ISFV-059 se digirió usando las enzimas de restricción MluI/Agel y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-VIH-018. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-021 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-N*₂-P₃-M₄-G₅-L₆-3', tiene cambios de nucleótidos silenciosos en la transmembrana región de ISFV GΔCT25 para reducir la riqueza de A/T en comparación con la secuencia nativa, y el codón de parada de ISFV GΔCT25 es parte de la parada transcripcional en la unión del gen ISFV GΔCT25 - L.

Enfoque B - Construcción

- 35 El plásmido pPBS-ISFV-056 se digirió usando las enzimas de restricción MluI/NheI y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-VSV-VIH-020, que contiene una secuencia antigénica de un vector rVSV atenuado (N4CT1) que expresa gag del VIH-1 del primer casete transcripcional. La construcción resultante pPBS-ISFV-057 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag)₁-VSV P₂-VSV M₃-VSV N₄- ISFV GΔCT25₅-VSV L₆ -3' y, por lo tanto, el 3'-NCR de G CT1 del VSV está vinculado al marco de lectura abierto que codifica ISFV GΔCT25.

- 45 Se generó un fragmento de PCR con los cebadores ISF_148 - TGTTAGCGTCTCTCATAAAAATTA AAAACT-CAAATATAATTG (SEQ ID NO:66) y ISF_69 - AACAGAGGTCAAACGCGTGTCAA AATGACTTCAGTTTTATTCATG (SEQ ID NO:67) y usando pPBS-ISFV-057 como plantilla e insertado en pPBS-ISFV-051 a través de MluI/BsmBI para generar pPBS-ISFV-058.

- 50 Finalmente, se digirió pPBS-ISFV-058 usando las enzimas de restricción MluI/Agel y el inserto aislado se ligó con un fragmento de vector correspondiente procedente de pPBS-ISFV-VIH-018. La construcción resultante pPBS-ISFV-VIH-021 comprende, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico 5'-(VIH-1 gag SDE)₁-N*₂-P₃-M₄-G₅-L₆ -3', tiene cambios de nucleótidos silenciosos en la región transmembrana de ISFV GΔCT25 para reducir la riqueza de A/T en comparación con la secuencia nativa, y comprende el 3'-NCR de VSV GCT1 en la unión del gen ISFV GΔCT25-L.

Ejemplo 3

55 ESTUDIOS DE ANIMALES

- 60 Se realizó una serie de estudios en ratones para investigar la seguridad y eficacia relativas de las composiciones inmunogénicas que comprenden vectores rISFV que expresan proteínas de alfavirus. El modelo DL₅₀ intracraneal (IC) de ratón se usó para una evaluación primaria de la seguridad del vector debido a las propiedades conocidas de neurovirulencia de los vesiculovirus y virus relacionados (Olitsky et al., Journal of Experimental Medicine. 1934, 59:159-71; Frank et al., Am J Vet Res. 1945, Jan:28-38; Sabin et al., Journal of Experimental Medicine. 1937, 66:15-34; Rao et al., Lancet. 2004, 364(9437):869-74). La eficacia se evaluó en estrictos modelos de exposición a VEEV y EEEV.

- 65 *Neurovirulencia de vectores rISFV.* Se realizó un estudio piloto para investigar las propiedades de neurovirulencia del rISFV no modificado y una variante altamente atenuada que expresa gag del VIH-1 (rISFV-N4 GΔCT25

VIH_{gag1}). Se utilizó un vector rVSV_{IN} N2CT1 con una DL₅₀ conocida de estudios previos como control positivo (Clarke et al., J Virol. 2007, Feb;81(4):2056-64). Grupos de 10 ratones Swiss Webster hembra de cinco semanas de edad se inocularon con 25 µl de diluciones en serie de 10 veces de cada virus a través de la ruta intracerebral (IC) y se observó letalidad en los animales durante 21 días. PBS se usó como control para el proceso de inyección (Tabla 4).

Se observó letalidad limitada en animales inyectados con vectores rISFV y, en consecuencia, no se pudo determinar una DL₅₀ (Tabla 4). Por el contrario, rVSV_{IN} N2CT1 causó letalidad y se determinó una DL₅₀ (10⁴ ufp) similar a la determinada en estudios previos (Tabla 4). Estos datos sugieren que rISFV es inherentemente menos neurovirulento que rVSV_{IN}, que demostró una DL₅₀ de 5-10 unidades formadoras de placa (UFP) en su forma no modificada (Clarke et al., J Virol. 2007, Feb;81(4):2056-64).

Tabla 4. Título de DL₅₀ de vectores rISFV y rVSV_{IN} en ratones Swiss Webster

Construcción vírica	N	Dosis (ufp)	Supervivencia (%)	DL ₅₀ (ufp)
rISFV N4ΔCT25 VIH _{gag1}	10	10 ⁷	100	> 10 ⁷
	10	10 ⁶	100	
	10	10 ⁵	100	
	10	10 ⁴	100	
	10	10 ³	100	
rVSV _{IN} N2CT1	10	10 ⁴	50	10 ⁴
	10	10 ³	90	
	10	10 ²	90	
rISFV	10	10 ³	80	> 10 ³
	10	10 ²	100	
	10	10 ¹	100	
PBS	10		100	

Eficacia protectora de los vectores rISFV. Se realizó una serie de estudios para investigar el potencial del rISFV como vector para la protección contra la infección y la enfermedad por alfavirus. Para estos estudios, se inmunizaron ratones hembra CD-1 de 4 a 6 semanas de edad por vía intramuscular usando un volumen de dosis de 50 µl. Los ratones fueron expuestos con 10⁴ UFP de VEEV-ZPC o EEEV-FL93 inyectados por vía subcutánea. Todos los procedimientos y el cuidado de los animales se ajustaron a las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

Protección a corto plazo contra la exposición a VEEV y EEEV. Para determinar si los vectores rISFV-N4G3 que codifican E3-E1 de VEEV-ZPC o EEEV-FL93 en la quinta posición podrían proteger contra la exposición letal con VEEV y EEEV, se inmunizaron cohortes de ratones CD-1 con 10⁸ UFP de los vectores y luego se expusieron 3-4 semanas después de la inmunización (Tabla 5). Después de la inmunización, se detectó fácilmente una respuesta de anticuerpo neutralizante en ratones inmunizados con rISFV- N4G3- (EEEV-FL93 E3-E1) 5, mientras que se detectó poco anticuerpo neutralizante en animales inmunizados con rISFV- N4G3- (VEEV-ZPC) 5 (Tablas 6, 7). Independientemente de la respuesta de anticuerpos, todos los animales estaban protegidos contra la exposición letal a EEEV-FL93 y VEEV-ZPC (Figura 6 y Figura 7).

Tabla 5. Diseño del estudio para los estudios de exposición a VEEV-ZPC y EEEV-FL93

Grupo	Inmunización				Exposición		
	Construcción de inmunización	Dosis (ufp)	Vía	Número de animales	Virus	Dosis (ufp)	Vía
1	rISFV-N4G3-(VEEV ZPC E3 E1)5	10 ⁸	IM	10	VEEV ZPC	10 ⁴	SC
2	PBS		IM	10	VEEV ZPC	10 ⁴	SC
3	rISFV-N4G3-(EEEV FL93 E3 E1)5	10 ⁸	IM	10	EEEV FL93	10 ⁴	SC
4	PBS		IM	12	EEEV FL93	10 ⁴	SC

Tabla 6. Respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados con rISFV-N4G3-(EEEV-FL93 E3- E1)5

N.º de animal	PRNT ₈₀	
	Día 14	Día 21
1	40	80
2	0	0
3	40	20
4	40	320
5	40	160

(continuación)

N.º de animal	PRNT ₈₀	
	Día 14	Día 21
6	40	80
7	80	80
8	0	80
9	160	40
10	40	160
Media	48	102
DE	45	93

Tabla 7. Respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados con rISFV-N4G3-VEEV-ZPC E3-E1)5

N.º de animal	PRNT ₈₀	
	Día 21	Día 28
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	40
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

- 5 *Titulación de dosis y estudio de inmunidad a largo plazo.* Los animales se inmunizaron con 10^8 o 10^7 UFP de rISFV-N4G3-(VEEV-ZPC E3-E1)5 o rVSV_{IN} N4G_(CT-1)3-(VEEV-ZPC E3-E1)5 (Tabla 8). Después de la inmunización, se pudo detectar una respuesta de anticuerpos neutralizantes del VEEV en la mayoría de los animales inmunizados con rISFV-N4G3-(VEEV-ZPC E3-E1)5 a ambas dosis (Tabla 9). Se detectaron respuestas de anticuerpos neutralizantes más consistentes en todos los animales inmunizados con rVSV_{IN} N4G_(CT-1)3-(VEEV-ZPC E3-E1)5 (Tabla 10). Sin embargo, como se observó en el estudio anterior, independientemente de la respuesta de anticuerpos neutralizantes al VEEV, todos los animales estaban protegidos después de la exposición letal (Figura 8).

Tabla 8. Titulación de dosis y diseño del estudio de inmunidad a largo plazo

Inmunización					Exposición (4 y 30 semanas después de la infección)			
Grupo	Construcción de inmunización	Dosis (ufp)	Vía	N.º de animales	Virus	Dosis (ufp)	Vía	N.º de animales
1	rISF-N4G3-(VEEV ZPC E3-E1)5	10^8	IM	10	VEEV ZPC	10^4	SC	5
2	rISF-N4G3-(VEEV ZPC E3-E1)5 rVSV _{IN}	10^7	IM	10	VEEV ZPC	10^4	SC	5
3	N4G _(CT-1) 3-(VEEV-ZPC E3-E1)5 rVSV _{IN}	10^8	IM	10	VEEV ZPC	10^4	SC	5
4	N4G _(CT-1) 3-(VEEV-ZPC E3-E1)5	10^7	IM	10	VEEV ZPC	10^4	SC	5
5	PBS		IM	10	VEEV ZPC	10^4	SC	5

15 **Tabla 9.** Respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados con rISFV-N4G3-(VEEV-ZPC E3-E1)5

N.º de animal	10 ⁷ UFP		N.º de animal	10 ⁸ UFP	
	PRNT ₈₀			PRNT ₈₀	
	Día 25	Día 35		Día 25	Día 35
1	80	80	1	80	640
2	80	640	2	80	20
3	80	0	3	80	0
4	40	0	4	40	0
5	40	80	5	20	20
6	20	20	6	20	20
7	80	320	7	20	40
8	40	20	8	20	20

(continuación)

10 ⁷ UFP			10 ⁸ UFP		
PRNT ₈₀			PRNT ₈₀		
N.º de animal	Día 25	Día 35	N.º de animal	Día 25	Día 35
9	80	320	9	0	0
10	0	80	10	20	20
Media	54	156	Media	38	78
DE	30	208	DE	30	198

Tabla 10. Respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados con rVSV_{IN}-N4G_(CT-1)3-(VEEV-ZPC E3-E1)₅

10 ⁷ UFP			10 ⁸ UFP		
PRNT ₈₀			PRNT ₈₀		
N.º de animal	Día 25	Día 35	N.º de animal	Día 25	Día 35
1	640	640	1	80	20
PRNT ₈₀			PRNT ₈₀		
N.º de animal	Día 25	Día 35	N.º de animal	Día 25	Día 35
2	640	640	2	40	640
3	640	320	3	0	20
4	640	640	4	640	640
5	640	640	5	640	40
6	320	160	6	640	640
7	640	640	7	80	160
8	640	320	8	640	40
Media	600	500	Media	344	288
DE	113	199	DE	313	306

5 *Eficacia de las composiciones inmunogénicas combinadas.* Dado que una composición inmunogénica debería proporcionar protección contra más de un alfavirus, se diseñó un estudio para investigar si los animales inmunizados simultáneamente con rISFV- N4G3-(VEEV-ZPC E3-E1)₅ y rISFV-N4G3-(EEEV-FL93 E3-E1)₅ podrían protegerse contra la exposición letal contra EEEV-FL93 y VEEV-ZPC (Tabla 11). Como en estudios anteriores, se detectaron anticuerpos neutralizantes contra EEEV-FL93 y VEEV-ZPC en casi todos los ratones (Tablas 12 y 13) y todos los animales inmunizados se protegieron contra la exposición letal a EEEV-FL93 (Figura 9) o VEEV-ZPC (Figura 10). Estos resultados demuestran que las composiciones inmunogénicas combinadas pueden proporcionar protección contra la exposición letal de múltiples alfavirus.

Tabla 11. Diseño de estudio de inmunización combinada

Grupo	Inmunización		Exposición a VEEV-ZPC			Exposición a EEEV-FL93	
	Construcción de inmunización	Dosis* (ufp)	Vía	Número de animales	Dosis (ufp)	Vía	N.º de animales
1	rISF-N4G3-(VEEV ZPC E3-E1)5 y rISF-N4G3-(EEEV FL93 E3-E1)5	10 ⁸	IM	20	10 ⁴	SC	10
2	PBS		IM	20	10 ⁴	SC	10
							11

* Los animales del grupo 1 fueron inmunizados con 10⁸ ufp de cada virus

Tabla 12. Respuesta de anticuerpos neutralizantes contra EEEV-FL93 en ratones inmunizados con rISFV-N4G3-(EEEV-FL93 E3-E1)5 y rISFV-N4G3-VEEV ZPC E3-E1)5

N.º de animal	PRNT ₈₀	
	Día 14	Día 21
1	80	160
2	40	80
3	80	80
4	80	320
5	40	80
6	80	160
7	80	80
8	40	80
9	80	160
10	40	320
Media	64	152
DE	21	96

Tabla 13. Respuesta de anticuerpos neutralizantes contra VEEV-ZPC en ratones inmunizados con rISFV-N4G3-(EEEV-FL93 E3-E1)5 y rISFV-N4G3-VEEV ZPC E3-E1)5

N.º de animal	PRNT ₈₀	
	Día 14	Día 21
1	0	20
2	0	20
3	20	40
4	40	20
5	40	20
6	20	20
7	80	80
8	0	0
9	80	80
10	0	20
Media	28	32
DE	32	27

Ejemplo 4**ESTUDIO PBS-MU-062 DE SENSIBILIZACIÓN/REFUERZO CON VECTORES RVSV Y RISFV EN RATONES BALB/C**

Se realizó una serie de estudios en ratones para evaluar un régimen de sensibilización/refuerzo usando rVSV y rISFV que codifican un epítipo dominante único (SDE, de sus siglas en inglés) Gag del VIH en ratones Balb/c. Estos estudios se diseñaron para cumplir con dos objetivos de estudio: (a) PBS-Mu-062a: para estudiar la inmunogenicidad de dos nuevos vectores rISFV-VIH gag SDE en ratones, y para seleccionar el candidato preferido para un futuro estudio de sensibilización/refuerzo con rVSV_{IN} N4CT1Gag, y (b) PBS-Mu-062b: para comparar las respuestas inmunes obtenidas utilizando la combinación de sensibilización/refuerzo de rVSV_{NJ}/rVSV_{IN} y rISFV/rVSV_{IN}.

PBS-Mu-062a: Para este estudio, se comparó la inmunogenicidad relativa de dos vectores de expresión de gag del VIH basados en rISFV candidatos con el objetivo de avanzar en la construcción más inmunogénica en futuros estudios de sensibilización/refuerzo con vectores de expresión de gag del VIH basados en rVSV_{IN}. Se proporciona un resumen del diseño del estudio PBS-Mu-062a en la Figura 13. Para este estudio, se inmunizaron ratones BALB/c (n = 5/grupo) mediante inyección intramuscular con 10⁷ ufp de los vectores que expresan gag del VIH indicados en la Figura 12 y, diez días después, los esplenocitos se recogieron y se analizaron para detectar la secreción del IFN-γ específico de gag SDE del VIH y del conjunto de péptidos N del rVSV_{IN} mediante análisis ELISpot (Figura 14). En este estudio, la inmunización con rISFV-VIH-016 (rISFV) dio como resultado una respuesta ELISpot media de interferón-γ de gag del VIH de 236 ± 74 SFC/10⁶ esplenocitos, una respuesta que no fue significativamente diferente a la respuesta ELISpot específica de gag SDE del VIH (147 ± 32 SFC/10⁶ esplenocitos) provocada por el otro rISFV-VIH gag candidato rISFV-VIH-018 (rISFVN*) (Figura 14, izquierda). De manera importante, el vector rISFV-VIH-018, que codifica una proteína N vírica con una serie de mutaciones en un epítipo restringido a H2d conocido, mostró una tendencia reducida a provocar respuestas ELISpot específicas del conjunto de péptidos N antivector rVSV_{IN} N (45 ± 15 SFC/10⁶ esplenocitos) en comparación con el rISFV-VIH gag candidato rISFV-VIH-016 (140 ± 59 SFC/10⁶ esplenocitos) que codifica un gen N vírico de tipo silvestre (Figura 14, derecha). Basándose en estos resultados, se eligió rISFVN* (rISFV-VIH-018) para su uso en experimentos posteriores de rVSV/rISFV de sensibilización/refuerzo.

PBS-Mu-062b: Para este experimento, se comparó la inmunogenicidad relativa de varios regímenes de inmunización

de sensibilización/refuerzo utilizando vectores basados en rVSV exclusivamente frente a una combinación de vectores basados en rISFV y rVSV. Se proporciona un resumen del diseño del estudio PBS-Mu-062b en la Figura 16. Para este experimento, se inmunizaron ratones BALB/c ($n = 5/\text{grupo}$) mediante inyección intramuscular con 10^7 ufp de los vectores que expresan SDE rgVF VIH gag descritos en la Figura 15 en combinación con la construcción rVSV_{IN} VIH gag SDE (Figura 12). Los ratones se inmunizaron en un esquema de 0 y 4 semanas. Una semana después de la inmunización final, se recogieron los esplenocitos y se analizaron para determinar la secreción de IFN- γ específica del SDG gag del VIH (Figura 17) y específica del conjunto de péptidos N del rVSV_{IN} (Figura 18) mediante análisis ELISpot. En este estudio, los ratones inmunizados con el régimen de sensibilización/refuerzo de rVSV_{NJ}/rVSV_{IN} demostraron una respuesta de ELISpot específica de SDE gag del VIH ($2.330 \pm 412 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos) que fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la respuesta observada en ratones inmunizados con el régimen heterólogo de sensibilización/refuerzo de rISFVN*/rVSV_{IN} ($4.758 \pm 183 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos) (Figura 17). Este aumento significativo de dos veces en la respuesta de ELISpot del IFN- γ específica de SDE gag del VIH en comparación con los ratones inmunizados con rVSV_{NJ}/rVSV_{IN} no se vio afectado al cambiar el orden del régimen heterólogo (rVSV_{IN}/rISFVN*; $5.870 \pm 1.258 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos) o por la presencia de un gen N vírico de tipo silvestre en el vector rISFV (rISFV/rVSV_{IN}; $5.061 \pm 890 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos) (Figura 17). Como se muestra en la Figura 18, los regímenes heterólogos de sensibilización/refuerzo de rISFVN*/rVSV_{IN} y rVSV_{IN}/rISFVN* produjeron respuestas de ELISpot medias significativamente menores ($p < 0,05$) del IFN- γ específicas del conjunto de péptidos N del rVSV_{IN} (451 ± 67 y $408 \pm 55 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos, respectivamente) en comparación con el régimen rVSV_{NJ}/rVSV_{IN} ($2.794 \pm 456 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos) o el régimen rISFV/rVSV_{IN} ($1.459 \pm 238 \text{ SFC}/10^6$ esplenocitos).

Los estudios mencionados anteriormente demuestran claramente que los regímenes de inmunización heterólogos de sensibilización/refuerzo de rISFV/rVSV_{IN} y rVSV_{IN}/rISFV provocaron respuestas de ELISpot del IFN- γ significativamente más altas que el régimen de inmunización rVSV_{NJ}/rVSV_{IN} en ratones. Asimismo, la mutación N* del rISFV redujo las respuestas de reacción cruzada a N del rVSV, aunque esto no dio lugar a un aumento en la respuesta de ELISpot del IFN- γ específico de gag SDE del VIH.

Ejemplo 5

ESTUDIO DEL VECTOR RISFV QUE EXPRESA LA GLUCOPROTEÍNA DEL VIRUS DE CHIKUNGUNYA EN RATONES A129

El virus Chikungunya (CHIKV) es un virus transmitido por mosquitos del género *Alfavirus* en la familia *Togaviridae*. La infección por CHIKV en seres humanos produce fiebre alta, cefalea, vómitos, erupción cutánea y artritis dolorosa. La artritis, que puede persistir durante meses o incluso años (Powers y Logue. *J. Gen. Virol.* 2007, 88:2363-2377), es el sello distintivo de una infección por CHIKV generalmente autolimitante. Sin embargo, en epidemias recientes en el subcontinente indio y las islas del Océano Índico, que afectaron a más de 1,5 millones de personas, algunas personas han mostrado síntomas más graves, como encefalitis, enfermedad hemorrágica y mortalidad (Schwartz y Albert. *Nature Rev. Microbiol.* 2010, 8:491-500). La propagación más reciente y rápida del CHIKV en las islas del Caribe y las Américas (Powers. *J. Gen. Virol.* 2015, 96:1-5) ha generado una necesidad aún más urgente de composiciones inmunogénicas contra el CHIKV.

El CHIKV tiene un genoma de ARN de 11,8 kb con sentido positivo único, que codifica cuatro proteínas no estructurales (nsP 1-4) y cinco proteínas estructurales (C, E3-E2-6K-E1). Las proteínas estructurales se escinden de un precursor para generar las glucoproteínas de la cápside y la envoltura (Strauss y Strauss. *Microbiol. Rev.* 1994, 58:491-562). Las proteínas E2 y E1 forman un heterodímero estable y los heterodímeros E2-E1 interactúan para formar la espícula que se encuentra en la superficie del virus. E2 se forma como un precursor llamado PE2 o p62 que se divide en E2 y E3. Hay un pequeño péptido hidrófobo llamado 6K que se produce como un enlazador entre E2 y E1. Cuando se procesa la poliproteína E3-E2-6K-E1, se producen las glucoproteínas E2 y E1, que luego forman los heterodímeros de glucoproteína E2-E1 (Strauss y Strauss, páginas 497-499).

El punto de partida para construir un vector rISFV atenuado que expresa la glucoproteína E2-E1 fue el plásmido denominado pVSV Δ G-CHIKV, que se recibió del Dr. John Rose (Universidad de Yale) (Chattopadhyay et al. *J. Virol.* 2013, 87:395-402). Este plásmido contenía una secuencia génica optimizada de Chikungunya E3-E2-6K-E1 (GenScript, Inc.) en lugar del gen G del VSV dentro del ADNc genómico del rVSV. La secuencia CHIKV-E3-E2-6K-E1 se amplificó mediante PCR utilizando los siguientes cebadores:

Cebador Alfa_001: GGGCCCACTCGAGAACATGAGCCTGGCCATCCCCGTG (contiene el sitio XhoI y la secuencia Kozak) (SEQ ID NO: 69)

Cebador Alfa_002: 61/ (Contiene el sitio NotI y el sitio NheI) (SEQ ID NO: 70)

El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción Xho/NotI y se clonó en ADNc del vector rVSVN4CT1. Este ADNc de vector se amplificó y se digirió con las enzimas de restricción Xho/NotI y el inserto liberado que codifica las proteínas CHIKV-E3-E2-6K-E1 se clonó en pPBS-ISFV-VIH-015 digerido con Xho/NotI (descrito anteriormente en el Ejemplo 2). El ISFV recombinante (rISFV) que codifica las proteínas CHIKV-E3-E2-6K-E1 se rescató de este ADNp como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. El resultado fue un rISFV-N4 G-CT Δ 25(CHIKV GP)1 denominado virus pPBS-ISFV-Alpha-003 que expresa CHIKV-GP desde la primera posición en el

genoma de rISFV, y donde CHIKV-GP representa CHIKV-E3- E2-6K-E1.

- El virus rescatado se purificó en placa y se amplificó en monocapas de células Vero E6 (ATCC CCL-81). Para estudios en animales, los vectores de virus se purificaron de sobrenadantes de células BHK-21 (ATCC CCL-10) infectados mediante centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 10 %. El virus purificado se resuspendió en PBS, pH 7,0, se mezcló con un estabilizador de fosfato de sacarosa (SP, de sus siglas en inglés) (K₂HPO₄ 7 mM, KH₂PO₄ 4 mM, sacarosa 218 mM), se congeló en etanol/hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta que esté listo para su uso.
- Se realizó un estudio para investigar la seguridad y la eficacia de una composición inmunogénica que comprende el vector rISFV-N4G-CTΔ25(CHIKV GP)₁ descrito anteriormente que expresaba CHIKV-GP desde la primera posición. Los ratones numerados del 11-21 que carecían del receptor para interferón tipo 1 (ratones A129) se inmunizaron con 1 X 10⁷ ufp de rISFV-N4G-CTΔ25(CHIKV GP)₁ en su almohadilla plantar izquierda. La almohadilla plantar derecha no se inyectó para servir como control. Los ratones A129 numerados del 1 al 10 no se inmunizaron como controles adicionales. Los 21 ratones fueron inyectados en la almohadilla plantar izquierda con una dosis de 10 µl de 1 X 10⁴ ufp del aislado LaReunion del CHIKV y se midió la hinchazón. La altura de la almohadilla plantar derecha también se midió como un control interno. Las alturas de las almohadillas plantares izquierdas no se tomaron el día de la inyección. Los datos anteriores mostraron que los tamaños de los pies izquierdo y derecho eran idénticos.
- Como se muestra en la Figura 19, los ratones 11-21 inmunizados con rISFV-N4G-CTΔ25(CHIKV GP)₁ mantuvieron su peso corporal después de la exposición, mientras que los ratones no inmunizados perdieron peso hasta el día 4 después de la exposición.
- Como se muestra en la Figura 20, los ratones inmunizados 11-21 tenían una inflamación menor de la almohadilla plantar izquierda para el día 3, que se resolvió para el día 5. Por el contrario, los ratones no inmunizados 1-10 habían dejado un hinchazón de la almohadilla plantar que continuó aumentando durante el día 4. Ambos grupos de ratones no tenían inflamación de la almohadilla plantar derecha.
- Como se muestra en la Figura 21, los ratones inmunizados 11-21 no mostraron viremia en la sangre en los días 1 o 2 [por debajo del límite de detección de 100 ufp/ml]. Por el contrario, los ratones no inmunizados 1-10 tenían signos de viremia en el día 1, que aumentó a casi 1 X 10⁷ ufp/ml en el día 2.
- Para el día 3, todos los ratones no inmunizados mostraron signos de enfermedad, incluyendo hinchazón de la almohadilla plantar, pelaje erizado y letargo. Por el contrario, todos los ratones inmunizados eran normales en apariencia y comportamiento. Como se muestra en la Figura 22, para el día 5, los 10 ratones no inmunizados sucumbieron a la enfermedad. Por el contrario, los 11 ratones inmunizados sobrevivieron sin signos de enfermedad.
- Todos los ratones inmunizados con suero rISFV-N4G-CTΔ25(CHIKV GP)₁ se convirtieron el día 21 según lo determinado por los títulos de neutralización de reducción de placa (PRNT₈₀) de los sueros tomados los días 1, 7 y 21 después de la inmunización como se muestra en la Tabla 14 (los números en negrita indican un resultado positivo):

Tabla 14. Respuesta de anticuerpos neutralizantes contra CHIKV en ratones inmunizados con rISFV que expresan glucoproteína de Chikungunya

Numero de Ratón	Día 1	Día 7	Día 21
11	1/20	1/20	1/40
12	1/160	1/40	1/80
13	1/20	1/40	1/40
14	1/40	1/20	1/40
15	< 1/20	< 1/20	1/40
16	< 1/20	1/20	1/40
17	1/40	< 1/20	1/40
18	1/20	1/20	1/40
19	1/40	1/40	1/80
20	1/320	1/80	1/80
21	1/40	1/40	1/40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nasar, Farooq Matassov, Demetrius Gorchakov, Rodion V. Hamm, Stefan V. Nowak, Rebecca V. Seymour, Robert L. Eldridge, John H. Tesh, Robert B. Clarke, David K. Latham, Theresa E. Weaver, Scott C.

<120> Vectores víricos de Isfahan recombinantes

<130> UTMB0395WO

ES 2 749 381 T3

<150> 61/946.734
 <151> 01-03-2014

5 <160> 70

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 11088
 <212> ADN
 <213> Virus Isfahan

15 <400> 1

acggagaaaa	acaaaccaat	tcacgcatta	gaagattcca	gaggaaagtg	ctaacagggg	60
tcaaaatgac	ttctgtagta	aagaggattg	ctactggctc	aagtgtggtg	gcagtactac	120
ccgccaatga	agaccctgta	gagtttccag	gggactatth	tttgcaaaat	ccgggaaaaa	180
taagggtgtg	catcaacaga	aaattagacg	ttgccacact	ccgccaatat	gtctacgagg	240
gactaaaaaa	tggggatgtc	catgtgtgtc	acatcaattc	atacctgtac	caggtgctca	300
aagacaccag	agatgaggcc	caaagtgatt	ggatatctth	cggagtgtcc	cttgcagtca	360
aaggtggcat	tgtcagtgtg	tttgacaccc	ttatgattga	ggattacagg	ggagaggctc	420
cggatgggag	gaaatgcat	ggaagaacca	tcgacgatga	caaatggctg	ccaatgttaa	480
tcctcggcct	atacaggggtg	tcgagagcga	cacaagaaga	ctacaaaaag	tcactactgc	540
agaaactcta	cgctcagtgc	aagctgagga	gtcctcaagc	tgaagaatta	gttgaagacg	600
cagcagaatt	ttatgaagtt	tgggtccaatg	attcaactt	cctaaaattg	gttgcagcaa	660
ttgacatggt	ctttcacaaa	ttcaaaaacc	atgcagatgc	aggcttgaga	tggggaacca	720
ttgtgtcacg	atttaaagat	tgtgccgcct	tggcaacatt	gtctcatgta	cagaaagtga	780
ctggcctgtc	aatcaaagaa	gtgttcacct	gggttctgaa	caaatcagtt	gaagatgagt	840
tgtgcagaat	gatgaaagaa	agacaagaag	tggacaaagc	tgattcctac	atgccttacc	900
tgattgattt	cgggatctca	acaaaatccc	cctattcatc	agtaaagaac	ccgtgttttc	960

ES 2 749 381 T3

atttctgggg acaactgaca gcactgctgg tccactctca cagagctaaa aacgcaaggg 1020
 tcccagaaga catcccttat aatgagctga ctacagcagc atggctgttc gcttatgcaa 1080
 tgggaagatc atccggattg gaacagcggg tcacgacgga tgacagtat tatcaggaag 1140
 atgaggatat caacaaagga ctcgagctca aagctcccac cacaagagat gtgcaaatgt 1200
 ggttggcctg gtggagtgac atcggtaagg ttccaacaca ggacatggaa acattcgsaa 1260
 gacgtgaggt attgggcctc acagagatca gatcaaaaac tattggtgag tatgccaaga 1320
 agacattcag tgtctaagaa ttcaaatcaa catatatgaa aaaaatcaac agagatacaa 1380
 caatgtctcg actcaaccaa attttgaagg attaccctct gttagaggcc acaacatctg 1440
 agattgagag tatggaatcc tcattggctg atgatgttat cacctcgaat gacgatgaaa 1500
 ttcaaagtgt gtctcctcaa tattacctcc gtgatatggt taaggcgagc atcacggaag 1560
 gtcctgatga tgacttcctc ccggtgccag aggtcgagaa tgacatcatc ttagatgacg 1620
 atgaggaata tgatggatat aaagtggatt ttgcagaagc cagaccctgg actgcaactga 1680
 cccagaagaa tatagatgga aggatgaacc tggattgat ggctccgga aacctcactg 1740
 acgctcagta caaacaatgg gtggaaagtg tttcttccat catgacaatt tcccgtcaga 1800
 tccgattgca tcaggcagag atcatggaca cttcatcagg gcttctaate attgagaaca 1860
 tgattccatc cataggcagg acatcagagt tcaaatccat tccagagcat attcctccga 1920
 gcccgacgtc agatcacacc actccacctt cgagcttacg gtcagatacc ccgagtcaaa 1980
 catcatctag cagcatgggg ttacctgatg tcagttctgc ttcagattgg agcggaatga 2040
 tcaacaaaaa gatccggatc ccgcccgttg tcagttcaaa atctccgtat gaattcacc 2100
 tttctgatct gtatggatca aatcaggctg ctcttgatta cttagtga tcaaggatgg 2160
 acctgaggac agctgtgtgc tcagggtca aacagagagg gatctacaat cgaattagga 2220
 ttcagtacaa gataaccca gaattcgtat gattttgatc aaagaaactg actgaggctc 2280
 aaactacaat atagctgcaa caattgcaat tgtttcgtga ttgaaatgta tgaaaaaat 2340
 taacagaggt caaatctggt tcacaacct gaagagctta aagagactga ttaagtcgaa 2400
 caaaaagaag ggagacaaga aaaatgtctc cttcatggat tgggatgagc ctctagtta 2460
 ctcaactct agatatggat gctatccttc tgctcctttg tttggagtgg atgaaatgat 2520
 ggaacactt cccactctgg ggatccaatc attaaagatt cagtataaat gcagcctaca 2580
 ggtcagggct gagactcctt tcaactagct caatgatgcc gcccggtgca ttagcctctg 2640
 ggagactgat tatcgaggct acgctgggaa gaaacccttc tatcgtctcc ttatgttgat 2700
 tgctacaaaa aaactcagag cagctccgat gagtctaatt gatggcaaca ggcctgaata 2760
 tagctctatg attcaaggct aatcaattgt ccaccacagt ctgggagtca ttcctcctat 2820
 gatgcatgtg cctgaaacat tcacaagaga atggaatttg ctgacaaata aaggaatgat 2880

ES 2 749 381 T3

cacagctcaa atctggctag ggatcacaga tgttgtagat gatctcaatc cattgatcaa 2940
tccagcactc ttctcagatg agaaagaaat gactcttacg agtcagatgt tcggggttggga 3000
gctcaaaaag aggaatgata atacatggtt gatcagtaag agctattgat caactgaaga 3060
gttggtgatc gaattataac atgcagaaga aagatatgaa aaaaattaac agaggtcaaa 3120
atgacttcag tcttattcat ggttggtgtg ctcttggggg cctttggttc aaccattgt 3180
agtattcaaa tcgttttccc cagtgaaca aaactcgtat ggaagccagt attaaaaggg 3240
accaggtact gtccacaaaag tgcagaatta aatctggaac ccgacttgaa aactatggct 3300
tttgacagca aagttccaat tggcataacg ccttccaact cggatggcta cctgtgtcat 3360
gctgccaaat gggtcacaac atgtgatttt cgatggtatg gaccgaagta cataactcac 3420
tctgtccaca gcttgagacc aacagtttct gattgtaaag cggccgtaga agcttacaat 3480
gctggtactc tcatgtaccg gggttttcct cctgaatcct gtggatatgc atctatcacg 3540
gattctgaat tttatgtcat gctagtaact ccgcatcctg ttggagtgga tgattacaga 3600
ggacactggg tggatccatt gtttcctact agcgagtgca attccaattt ttgtgagact 3660
gttcacaatg ccactatgtg gatcccgaaa gatcttaaaa ctcatgatgt ttgttctcag 3720
gacttccaga cgattagggg ttccgtgatg tctcctcaaa ccaaaccac caagggggca 3780
gacttgacac tgaaaagtaa gttccatgct cacatgaaag gtgacagagt ctgcaagatg 3840
aaattctgca acaaaaatgg gttgcgactg ggaaacggag aatggattga agttggggat 3900
gaggtcatgc tcgataactc gaaactcttg agtttattcc cagattgttt ggttggttct 3960
gtggtaaaat ccactttgct ctcggaagga gttcaaacag cactgtggga gaccgacaga 4020
ctattagatt actcattgtg ccagaacaca tgggaaaaaa tcgatcgaaa agagccgctg 4080
tctgctgtgg acctgagcta tcttgcaoct agatcaccg gaaaggggat ggcatacatc 4140
gttgccaatg gatctttgat gtctgctcct gctagataca tcagagtttg gattgacagt 4200
cccatactta aggagataaa aggaaagaaa gagtcagcct ccggaattga cactgtcctt 4260
tgggaacaat ggctcccctt caatggaatg gagttaggac ctaatggatt gatcaagacg 4320
aagtcaggtt acaaatttcc gctatatctt cttggaatgg gcattgtaga tcaagatctt 4380
caagagttgt cctcagtga ccctgtagac caccacatg taccaattgc ccaggctttc 4440
gtttcagagg gagaagaagt cttctttggg gatacaggag tctctaaaaa cccaatcgag 4500
ctgatatctg gctggttctc agattggaaa gaaacagcag ccgcattagg gttcgctgca 4560
atatctgtga tcttaattat tggactaatg aggctgttgc cactattatg caggaggaga 4620
aagcaaaaaa aagttatcta caaagacgta gaattaaatt cttttgatcc tagacaagct 4680
tttcacagat gaaagtatga aaaaaacgaa tcaacagagt tcatcatgga tgagtactct 4740

ES 2 749 381 T3

gaagaaaagt ggggcgattc tgatgaagaa tcttttgcca cagggaaata ttctgacgag 4800
 tctagaataa gaggattaa ttctgttgac tataatctaa actctccctt aattcaagat 4860
 gatctgtact atctaattgga acgagtgcgt ggaagaccgg tacctcccat ttggaagca 4920
 aaaaattgga ccgaaactat acatctgggt caagaaagta gattagatta tttaccaaca 4980
 cagaagctac acagttggta tgcggaatgg ctcatggagg agagtcatga ctctctcaa 5040
 ggactagcat tcttgaagga agtggacaaa gacagtttg aaacatacga agttgttatg 5100
 tcattcctaa ggggctggtg tgggtggtgct ccggcgata aaaagaaaga agggcgacac 5160
 atagcaaaga taggatcatt atgccagaaa ttcttgatc tccaccgagt catacttata 5220
 atgaatgctt ctaccagat ggagttgtca aatttggcag agacatttca ggcctcttct 5280
 gtgtcaaaga aaattattac aacaccctca atgggaaaga tggagatgag tggacaattt 5340
 gcacttgcac accagcaaaa agtcatactt gatagaaact tcttattaat gatgaaagat 5400
 gttgtgattg gaaggatgca aacattggtt tccatggtt ctcgaacaga tgacaagttc 5460
 tctgatgggg acattagtta cttaatcaag atttatcaat tgggtgataa aatcattcaa 5520
 tcgctaggaa atgatggata tgagctgatt aaaacaatag agcccatgtg caacttgaga 5580
 ctgtctgatt tagccagaga atatcggcct ctcataccgg agttccctca ctttcgccag 5640
 catatcgagg gaaccgtgtc agagctcaga aaaaagactg cgttgattgt agacatgttc 5700
 aagatgatag atcggacacc aggagtggat ataacattag taatatacgg atctttccgt 5760
 cattggggcc atcccttcat tgattatfff gcggggttga caaaattgaa ttcccaagtc 5820
 actatgggga aacagattga tgatgagat gtggcctgcc tggcaagtga cttggcaaga 5880
 attgtgctca ctaaggaatt caatgagaaa aagagatgga gtgtgaacta caatttagtt 5940
 cctcaggatc atccttttca tgaacacatc cgagacaata catggcctac tccagccgtg 6000
 atacaagatt ttggggacaa atggcatgag ttaccactca ctcaatgctt tgaattcct 6060
 gatttgatag acccttctat catctactcg gataaaagtc actccatgaa tcgacaagat 6120
 gtactaaatc atgtaaagag aaaaccagat caacctatac ctagcaggaa agttttgcaa 6180
 actatgatag atacacctgc cactaactgg ttggagtttt tggagaaat tgacaaaaat 6240
 gggttgagtg atgatgacct ggtgattggg ctaaaaggga aggaaagaga attgaagata 6300
 gccgggagat ttttctcact aatgtcgtgg aagctgagag aatattttgt gatcacggaa 6360
 tatctaatta agacacactt tgtaccactt ttccacggct tgacaatggc agatgacatg 6420
 acggctgtaa taaagaaaat gttggaaagt tcaagtggac agggctctaa agattattcg 6480
 gcagtatgca ttgcaaacca cattgactat gagaaatgga acaaccatca gaggaaacgg 6540
 tcaaatgaac caatttttaa agtcatgggt caattcttgg ggtttcccaa ccttatatcg 6600
 aggactcatg aattctttga gaaaagtctc atctattata atggaaggcc tgatttgatg 6660

ES 2 749 381 T3

aaggtgcaag atggaagact tgtgaacaca acgaagcaat tggtttggtg ggaaggacag 6720
gcagggcgat tagaggggtt aagacagaag ggatggagca tcttaaactt attggttatt 6780
caaagggaat ccaagattcg gaacacagca gttaaagtcc ttgcacaagg tgataatcaa 6840
gtaatatgca cacagtacaa gacaaaacaa cacagaaatg aaacagaatt gcgatctgct 6900
cttactcaaa tgaattgaa taatgatgca gttatgaaag ccattgaatc tggaacaaac 6960
aaactagggtt tgttgatcaa ccaagatgaa acaatgcaat cagctgacta cctgaattac 7020
ggtaaagttc ccatatntag aggagtgata cgagggttag aaacaaaaag gtggtcacga 7080
gtgacttggtg taacaaatga ccaacttccc acctgtgcaa acttgatgct atcagtgtct 7140
actaatgccc ttactggtgc tcattttgat gtgacaccct tgaatgcat gatcacgtac 7200
aattatctcg gaaatcttc tagattgctc ctcaacatgc atgatcctgc tgtgagatgt 7260
tcactcttc agctctctca aaaacacaag atagatttat tcagtttcga atttaaagtt 7320
ggggtggtgt atttgatcc ttctatcgga ggtggttggtg gaaccgcatt atccagattc 7380
ttaattcgcg gatttccaga tccggtgacc gaaagcatat cattctggaa agtaatttat 7440
aacaatacc aagacaacag attgaagaag ttgtgtacag cattcggaaa tcccaaaatt 7500
gctcaattcc gctattcgca catagagaaa ttgttggaag atcctacgag cttgaatata 7560
tcgatgggca tgagtgcagc caacctggtg aagagcgaaa ttaagaagaa cttctgcgg 7620
aaaagaagga ctattgggaa tagcattggt agggacgccc taacctatat aactctgaa 7680
gacgaaaaga tcagatctta cttgtggagt ataaatcctc tattccccag atttttgagt 7740
gaattcaaat caggcacttt catgggaggt gcacttagtg tggtcagcct atttcagaac 7800
tccagaacca ttagaaatgt ttttaagat tatatgagtt ctgcgattga tgagttgatt 7860
accaaagtg aagtgaactc cttggagcat ttgtgtaaat ataagggtgt ccgcaatttc 7920
gatcaagtct ggaaatggtc tgctagccag gctgattatt tgaggagatt atcctgggg 7980
agaaaagttc ttgggactac aatccctcat ccattagaaa tgcttgagc gggcacaatc 8040
aagaataatt cctccaactg ttgtgagcat tccggccagg attacatctc ggtatttgt 8100
cccaaaggaa taagcaatgt gctcatagaa agaggcccta tggcagcata cctaggggtca 8160
aaaacatctg agtctacttc tattcttcaa ccatgggaga aagagagcaa aatcccgatc 8220
atcaaaagag ctactcgatt aagagatgcc attcattggt ttgtggagcc aagctccaac 8280
ttggcaaaga gcatcttgca aaacatcaca gcactaacag gagaagagtg gggatcatca 8340
ctagaaggat ttaagagaac ggggtctgct ctccatagat ttaccacatc acgaatgagc 8400
catggaggct tttgtgcca aagcccggct gcattgacaa ggatgatggc aaccacagat 8460
acaatgagcg actatgcaaa agacaattat gattttatgt tccaggcttg tctcctctt 8520

ES 2 749 381 T3

tctcagataa ccacttcggt tttactcctt gaaaccacaa tttcaaatac tgtacatfff 8580
 cacactcggg gtataaattg tgtgagaaag atagaggagc cgtggctgga aagtccaagt 8640
 gtactccaga gcaaggacgt atcaaacgta ttagcaagct ggagaaatgg agggaggatca 8700
 tgggggtgaac agctgcatca attaaaacct ctcaaaggag attgggagat attaaactcct 8760
 gcggagaaat cataccatgt cgggagaact ctaggatfff tgtttggcga tctaacagggt 8820
 cagtcacgga ttagagccga tgatagtcc ttattcccct taagcataca aaaacggctg 8880
 cgaggacgag ggtttcttag aggagtfff gatgggttg tgagggcaag tgcattgcaa 8940
 gttatccata gaagaagcct gacacaactg aagagacctg ccaatgccgt gtacggagga 9000
 ttgatattct tgattgacaa aatcagcgt tcatccacct tcatcaattt atgccgagat 9060
 ggaccaataa gagaagaact ctccagtatc ccacataaaa ttcctacatc atacctaca 9120
 tctaattcgg atctaggact gcatataagg aattacttca aatttcagtg taagtctgta 9180
 gagttgggga aatatcaatc agatttgga gatttatggc ttttctctga cttgctatct 9240
 tcaggattcg cgggacctta tgctttatca tcaaaagfff taaagagcct atataaaccc 9300
 tccctatcta gaagggatag gaacaatatc cgaaaattgg gtgctttgtc tcggttattg 9360
 agatcacatg agaactggc agaattgcat aaagaattct taacatcgca attgttattg 9420
 tgccaagagg aggtgcgcca cgcattgcaa tttggtatcc caaaaaatgt ctccgccaaa 9480
 tcatcaatgg tatgggggaa agaagcagtg tcgtatgtac tagacattcc agttgagttc 9540
 acatcccaaa aacagaccaa acatttgaac gcttgcccgc gtattcagga cccgacaatt 9600
 tctggattaa ggcttgaca gttgccacc ggggctcact acaagattag gacaattctc 9660
 aatgcttaca atattaagt tccggatgct ctatgtggag gtgatggatc cggaggaatg 9720
 actgctgcat gcctgcgata ttattcta tcaaggcaa tatttaatag cattcttgag 9780
 ttcgatggat caagcatgaa agggctcatc cctgatcctc caagtgcatt ggaaacagta 9840
 gatcaagga tggtagctg tgtaaatgct acaacatggt ggagaaatcc atccgacttg 9900
 agtcaagagc ggacatgga ttatttttg catttgaaga agagtttta catgaagatc 9960
 gatcttatca ttcttgatat ggaagttaga gacttccaaa tttcaaagct gatagaagga 10020
 aatttaagat tgaaaatctc aaaactgctg gaaaagaatg gtactttaat ctataaaacg 10080
 tatggcacia tcatctgctc agagacctca aatgtattaa caaccttggg tccactcttt 10140
 cactctgfff atatcgtcca aactgggtat agcagctcat tcacttctga ggtttatgta 10200
 ctgttttcta agcaaaagtc tttgttgat tctccatag tagattgggg atcattacia 10260
 tataattggg agaagctggc ctgttttagg aaccaagac aagaattcaa gagggcctta 10320
 agaattagaa gtagtagatc tttgatgga atacctcat ccttcttgcc tgatccattg 10380
 gtgaatctgg aaaccttct tcaaatatca ggtgtccct ctggagtgtc tcaccaactg 10440

ES 2 749 381 T3

gtcactgacg ttaaaagttc tggggcatcc ggcttgtcct cagctatagg gttgctagga 10500
 ttaatttctc acttcacttt agacgtgacc aaattatacg tacaagagta tcgaccacct 10560
 tctgacaatc gcctaataaa aatggctagt gcaatcaccg ggattagtta ttggatttca 10620
 atagcctacc atgatcaaca attaaatcaa gcaactaacct cagtaatcaa gaaatcattt 10680
 cctatacgtt ggggacttat aaatcatcga ctccactgga gtgtttctga tagatttcac 10740
 cgatcgaaaag acgttcgatt atctgattgc ctagcaggta taggaaactg gatccgaggc 10800
 atggagttga tgaagctgcc tgcaggcatg ttttcacaca aggaagtcaa tatgatcttg 10860
 tcaaaatata ttgcggtttt aaattatcat acaatatcaa gcaggacagg aattcttgag 10920
 attttgaat ctcaattctc tattattgat cgatctttga tgaccattac cacagacaac 10980
 attcagtcgt cagattggac agattaatca tatgaaaaaa actaaaaatc ggactaagca 11040
 cgctcacttg ttttactata atacgttagc tggttttggt gtctccgt 11088

<210> 2
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Virus Isfahan

5

<400> 2

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

10

ES 2 749 381 T3

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

Val Ser Arg Ala Thr Gln Glu Asp Tyr Lys Lys Ser Leu Leu Gln Lys
 145 150 155 160

Leu Tyr Ala Gln Cys Lys Leu Arg Ser Pro Gln Ala Glu Glu Leu Val
 165 170 175

Glu Asp Ala Ala Glu Phe Tyr Glu Val Trp Ser Asn Asp Ser Asn Phe
 180 185 190

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

His Ala Asp Ala Gly Leu Arg Trp Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys
 210 215 220

Asp Cys Ala Ala Leu Ala Thr Leu Ser His Val Gln Lys Val Thr Gly
 225 230 235 240

Leu Ser Ile Lys Glu Val Phe Thr Trp Val Leu Asn Lys Ser Val Glu
 245 250 255

Asp Glu Leu Cys Arg Met Met Lys Glu Arg Gln Glu Val Asp Lys Ala
 260 265 270

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

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

Thr Ala Leu Leu Val His Ser His Arg Ala Lys Asn Ala Arg Val Pro
 305 310 315 320

Glu Asp Ile Pro Tyr Asn Glu Leu Thr Thr Ala Ala Trp Leu Phe Ala
 325 330 335

Tyr Ala Met Gly Arg Ser Ser Gly Leu Glu Gln Arg Phe Thr Thr Asp
 340 345 350

Asp Ser Tyr Tyr Gln Glu Asp Glu Asp Ile Asn Lys Gly Leu Gly Val
 355 360 365

Lys Ala Pro Thr Thr Arg Asp Val Gln Met Trp Leu Ala Trp Trp Ser
 370 375 380

ES 2 749 381 T3

Asp Ile Gly Lys Val Pro Thr Gln Asp Met Glu Thr Phe Ala Arg Arg
385 390 395 400

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

Ala Lys Lys Thr Phe Ser Val
420

5 <210> 3
<211> 289
<212> PRT
<213> Virus Isfahan

<400> 3

ES 2 749 381 T3

Met Ser Arg Leu Asn Gln Ile Leu Lys Asp Tyr Pro Leu Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Thr Thr Ser Glu Ile Glu Ser Met Glu Ser Ser Leu Ala Asp Asp Val
 20 25 30

Ile Thr Ser Asn Asp Asp Glu Ile Gln Ser Val Ser Pro Gln Tyr Tyr
 35 40 45

Leu Arg Asp Met Phe Lys Ala Ser Ile Thr Glu Gly Pro Asp Asp Asp
 50 55 60

Phe Pro Pro Val Pro Glu Val Glu Asn Asp Ile Ile Leu Asp Asp Asp
 65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Gly Tyr Lys Val Asp Phe Ala Glu Ala Arg Pro Trp
 85 90 95

Thr Ala Leu Thr Gln Lys Asn Ile Asp Gly Arg Met Asn Leu Glu Leu
 100 105 110

Met Ala Pro Glu Asn Leu Thr Asp Ala Gln Tyr Lys Gln Trp Val Glu
 115 120 125

Ser Val Ser Ser Ile Met Thr Ile Ser Arg Gln Ile Arg Leu His Gln
 130 135 140

Ala Glu Ile Met Asp Thr Ser Ser Gly Leu Leu Ile Ile Glu Asn Met
 145 150 155 160

Ile Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ser Glu Phe Lys Ser Ile Pro Glu His
 165 170 175

ES 2 749 381 T3

Ile Pro Pro Ser Pro Thr Ser Asp His Thr Thr Pro Pro Ser Ser Leu
 180 185 190

Arg Ser Asp Thr Pro Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser Met Gly Leu Pro
 195 200 205

Asp Val Ser Ser Ala Ser Asp Trp Ser Gly Met Ile Asn Lys Lys Ile
 210 215 220

Arg Ile Pro Pro Val Val Ser Ser Lys Ser Pro Tyr Glu Phe Thr Leu
 225 230 235 240

Ser Asp Leu Tyr Gly Ser Asn Gln Ala Ala Leu Asp Tyr Leu Ser Gly
 245 250 255

Ser Gly Met Asp Leu Arg Thr Ala Val Cys Ser Gly Leu Lys Gln Arg
 260 265 270

Gly Ile Tyr Asn Arg Ile Arg Ile Gln Tyr Lys Ile Thr Pro Glu Phe
 275 280 285

Val

<210> 4
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Virus Isfahan

5

<400> 4

Met Lys Ser Leu Lys Arg Leu Ile Lys Ser Asn Lys Lys Lys Gly Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Asn Val Ser Phe Met Asp Trp Asp Glu Pro Pro Ser Tyr Ser
 20 25 30

Asp Ser Arg Tyr Gly Cys Tyr Pro Ser Ala Pro Leu Phe Gly Val Asp
 35 40 45

Glu Met Met Glu Thr Leu Pro Thr Leu Gly Ile Gln Ser Leu Lys Ile
 50 55 60

Gln Tyr Lys Cys Ser Leu Gln Val Arg Ala Glu Thr Pro Phe Thr Ser
 65 70 75 80

Phe Asn Asp Ala Ala Arg Cys Ile Ser Leu Trp Glu Thr Asp Tyr Arg
 85 90 95

10

ES 2 749 381 T3

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

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

Pro Glu Tyr Ser Ser Met Ile Gln Gly Gln Ser Ile Val His His Ser
 130 135 140

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

Glu Trp Asn Leu Leu Thr Asn Lys Gly Met Ile Thr Ala Gln Ile Trp
 165 170 175

Leu Gly Ile Thr Asp Val Val Asp Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Pro
 180 185 190

Ala Leu Phe Ser Asp Glu Lys Glu Met Thr Leu Thr Ser Gln Met Phe
 195 200 205

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

Ser Tyr
 225

<210> 5
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> Virus Isfahan

5

<400> 5

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

10

ES 2 749 381 T3

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

ES 2 749 381 T3

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> 6
 <211> 2093
 <212> PRT
 <213> Virus Isfahan

5

<400> 6

Met Asp Glu Tyr Ser Glu Glu Lys Trp Gly Asp Ser Asp Glu Glu Ser
 1 5 10 15

Phe Gly Thr Gly Lys Tyr Ser Asp Glu Ser Arg Ile Arg Gly Leu Asn
 20 25 30

10

ES 2 749 381 T3

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

Tyr Leu Met Glu Arg Val Arg Gly Arg Pro Val Pro Pro Ile Trp Lys
 50 55 60

Ala Lys Asn Trp Thr Glu Thr Ile His Leu Val Gln Glu Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Asp Tyr Leu Pro Thr Gln Lys Leu His Ser Trp Tyr Ala Glu Trp Leu
 85 90 95

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

Val Asp Lys Asp Ser Leu Glu Thr Tyr Glu Val Val Met Ser Phe Leu
 115 120 125

Arg Gly Trp Cys Gly Gly Ala Pro Ala Tyr Lys Lys Lys Glu Gly Arg
 130 135 140

His Ile Ala Lys Ile Gly Ser Leu Cys Gln Lys Phe Leu Asp Leu His
 145 150 155 160

Arg Val Ile Leu Ile Met Asn Ala Ser Thr Gln Met Glu Leu Ser Asn
 165 170 175

Leu Ala Glu Thr Phe Gln Ala Ser Ser Val Ser Lys Lys Ile Ile Thr
 180 185 190

Thr Pro Ser Met Gly Lys Met Glu Met Ser Gly Gln Phe Ala Leu Ala
 195 200 205

Tyr Gln Gln Lys Val Ile Leu Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Met Lys
 210 215 220

Asp Val Val Ile Gly Arg Met Gln Thr Leu Leu Ser Met Val Ser Arg
 225 230 235 240

Thr Asp Asp Lys Phe Ser Asp Gly Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Tyr Gln Leu Gly Asp Lys Ile Ile Gln Ser Leu Gly Asn Asp Gly Tyr
 260 265 270

Glu Leu Ile Lys Thr Ile Glu Pro Met Cys Asn Leu Arg Leu Ser Asp

ES 2 749 381 T3

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

ES 2 749 381 T3

Phe Phe Ser Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr
 530 535 540

Glu Tyr Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro Leu Phe His Gly Leu Thr
 545 550 555 560

Met Ala Asp Asp Met Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Leu Glu Ser Ser
 565 570 575

Ser Gly Gln Gly Leu Lys Asp Tyr Ser Ala Val Cys Ile Ala Asn His
 580 585 590

Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Arg Ser Asn Glu
 595 600 605

Pro Ile Phe Lys Val Met Gly Gln Phe Leu Gly Phe Pro Asn Leu Ile
 610 615 620

Ser Arg Thr His Glu Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly
 625 630 635 640

Arg Pro Asp Leu Met Lys Val Gln Asp Gly Arg Leu Val Asn Thr Thr
 645 650 655

Lys Gln Leu Val Cys Trp Glu Gly Gln Ala Gly Gly Leu Glu Gly Leu
 660 665 670

Arg Gln Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu
 675 680 685

Ser Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn
 690 695 700

Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Gln His Arg Asn Glu Thr
 705 710 715 720

Glu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Gln Met Lys Leu Asn Asn Asp Ala Val
 725 730 735

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

Gln Asp Glu Thr Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Val
 755 760 765

Pro Ile Phe Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser
 770 775 780

ES 2 749 381 T3

Arg Val Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Leu Pro Thr Cys Ala Asn Leu
 785 790 795 800
 Met Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Asp Val
 805 810 815
 Thr Pro Leu Asn Ala Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Asn Phe Ser
 820 825 830
 Arg Leu Leu Leu Asn Met His Asp Pro Ala Val Arg Cys Ser Leu Phe
 835 840 845
 Gln Leu Ser Gln Lys His Lys Ile Asp Leu Phe Ser Phe Glu Phe Lys
 850 855 860
 Val Gly Val Leu Tyr Leu Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Cys Gly Thr
 865 870 875 880
 Ala Leu Ser Arg Phe Leu Ile Arg Gly Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu
 885 890 895
 Ser Ile Ser Phe Trp Lys Val Ile Tyr Asn Asn Thr Gln Asp Asn Arg
 900 905 910
 Leu Lys Lys Leu Cys Thr Ala Phe Gly Asn Pro Lys Ile Ala Gln Phe
 915 920 925
 Arg Tyr Ser His Ile Glu Lys Leu Leu Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn
 930 935 940
 Ile Ser Met Gly Met Ser Ala Ala Asn Leu Leu Lys Ser Glu Ile Lys
 945 950 955 960
 Lys Asn Leu Leu Arg Lys Arg Arg Thr Ile Gly Asn Ser Ile Val Arg
 965 970 975
 Asp Ala Val Thr Tyr Ile His Ser Glu Asp Glu Lys Ile Arg Ser Tyr
 980 985 990
 Leu Trp Ser Ile Asn Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys
 995 1000 1005
 Ser Gly Thr Phe Met Gly Val Ala Ser Ser Val Val Ser Leu Phe
 1010 1015 1020
 Gln Asn Ser Arg Thr Ile Arg Asn Val Phe Lys Asp Tyr Met Ser
 1025 1030 1035

ES 2 749 381 T3

Ser Ala Ile Asp Glu Leu Ile Thr Lys Ser Glu Val Asn Ser Leu
1040 1045 1050

Glu His Leu Cys Lys Tyr Lys Gly Val Arg Asn Phe Asp Gln Val
1055 1060 1065

Trp Lys Cys Ser Ala Ser Gln Ala Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ser
1070 1075 1080

Trp Gly Arg Lys Val Leu Gly Thr Thr Ile Pro His Pro Leu Glu
1085 1090 1095

Met Leu Gly Ala Gly Thr Ile Lys Asn Asn Ser Ser Thr Cys Cys
1100 1105 1110

Glu His Ser Gly Gln Asp Tyr Ile Ser Val Phe Cys Pro Lys Gly
1115 1120 1125

Ile Ser Asn Val Leu Ile Glu Arg Gly Pro Met Ala Ala Tyr Leu
1130 1135 1140

Gly Ser Lys Thr Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu
1145 1150 1155

Lys Glu Ser Lys Ile Pro Ile Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg
1160 1165 1170

Asp Ala Ile His Trp Phe Val Glu Pro Ser Ser Asn Leu Ala Lys
1175 1180 1185

Ser Ile Leu Gln Asn Ile Thr Ala Leu Thr Gly Glu Glu Trp Gly
1190 1195 1200

Ser Ser Leu Glu Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg
1205 1210 1215

Phe Thr Thr Ser Arg Met Ser His Gly Gly Phe Cys Ala Gln Ser
1220 1225 1230

Pro Ala Ala Leu Thr Arg Met Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Ser
1235 1240 1245

Asp Tyr Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Met Phe Gln Ala Cys Leu
1250 1255 1260

Leu Phe Ser Gln Ile Thr Thr Ser Val Leu Leu Leu Glu Thr Thr

ES 2 749 381 T3

1265						1270								1275
Ile Ser	Asn Thr	Val His	Phe	His Thr	Arg Cys	Ile	Asn Cys	Val						
1280			1285			1290								
Arg Lys	Ile Glu	Glu Pro	Trp	Leu Glu	Ser Pro	Ser	Val Leu	Gln						
1295			1300			1305								
Ser Lys	Asp Val	Ser Asn	Val	Leu Ala	Ser Trp	Arg	Asn Gly	Gly						
1310			1315			1320								
Gly Ser	Trp Gly	Glu Gln	Leu	His Gln	Leu Lys	Pro	Leu Lys	Gly						
1325			1330			1335								
Asp Trp	Glu Ile	Leu Thr	Pro	Ala Glu	Lys Ser	Tyr	His Val	Gly						
1340			1345			1350								
Arg Thr	Leu Gly	Phe Leu	Phe	Gly Asp	Leu Thr	Gly	Gln Ser	Ser						
1355			1360			1365								
Ile Arg	Ala Asp	Asp Ser	Ser	Leu Phe	Pro Leu	Ser	Ile Gln	Lys						
1370			1375			1380								
Arg Leu	Arg Gly	Arg Gly	Phe	Leu Arg	Gly Val	Leu	Asp Gly	Leu						
1385			1390			1395								
Val Arg	Ala Ser	Ala Cys	Gln	Val Ile	His Arg	Arg	Ser Leu	Thr						
1400			1405			1410								
Gln Leu	Lys Arg	Pro Ala	Asn	Ala Val	Tyr Gly	Gly	Leu Ile	Phe						
1415			1420			1425								
Leu Ile	Asp Lys	Ile Ser	Ala	Ser Ser	Thr Phe	Ile	Asn Leu	Cys						
1430			1435			1440								
Arg Asp	Gly Pro	Ile Arg	Glu	Glu Leu	Ser Ser	Ile	Pro His	Lys						
1445			1450			1455								
Ile Pro	Thr Ser	Tyr Pro	Thr	Ser Asn	Ala Asp	Leu	Gly Leu	His						
1460			1465			1470								
Ile Arg	Asn Tyr	Phe Lys	Phe	Gln Cys	Lys Ser	Val	Glu Leu	Gly						
1475			1480			1485								
Lys Tyr	Gln Ser	Asp Leu	Glu	Asp Leu	Trp Leu	Phe	Ser Asp	Leu						
1490			1495			1500								

ES 2 749 381 T3

Leu Ser Ser Gly Phe Ala Gly Pro Tyr Ala Leu Ser Ser Lys Val
 1505 1510 1515
 Leu Lys Ser Leu Tyr Lys Pro Ser Leu Ser Arg Arg Asp Arg Asn
 1520 1525 1530
 Asn Ile Arg Lys Leu Gly Ala Leu Ser Arg Leu Leu Arg Ser His
 1535 1540 1545
 Glu Asn Trp Ser Glu Leu His Lys Glu Phe Leu Thr Ser Gln Leu
 1550 1555 1560
 Leu Leu Cys Gln Glu Glu Val Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile
 1565 1570 1575
 Pro Lys Asn Val Ser Ala Lys Ser Ser Met Val Trp Gly Lys Glu
 1580 1585 1590
 Ala Val Ser Tyr Val Leu Asp Ile Pro Val Glu Phe Thr Ser Gln
 1595 1600 1605
 Lys Gln Thr Lys His Leu Asn Ala Cys Pro Arg Ile Gln Asp Pro
 1610 1615 1620
 Thr Ile Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His
 1625 1630 1635
 Tyr Lys Ile Arg Thr Ile Leu Asn Ala Tyr Asn Ile Lys Cys Arg
 1640 1645 1650
 Asp Val Leu Cys Gly Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Ala
 1655 1660 1665
 Cys Leu Arg Tyr Tyr Ser Asn Ser Arg Ala Ile Phe Asn Ser Ile
 1670 1675 1680
 Leu Glu Phe Asp Gly Ser Ser Met Lys Gly Ser Ser Pro Asp Pro
 1685 1690 1695
 Pro Ser Ala Leu Glu Thr Val Asp Gln Gly Met Val Arg Cys Val
 1700 1705 1710
 Asn Ala Thr Thr Cys Trp Glu Asn Pro Ser Asp Leu Ser Gln Glu
 1715 1720 1725
 Arg Thr Trp Asp Tyr Phe Leu His Leu Lys Lys Ser Phe Asn Met
 1730 1735 1740

ES 2 749 381 T3

Lys Ile Asp Leu Ile Ile Leu Asp Met Glu Val Arg Asp Phe Gln
 1745 1750 1755

Ile Ser Lys Leu Ile Glu Gly Asn Leu Arg Leu Lys Ile Ser Lys
 1760 1765 1770

Leu Leu Glu Lys Asn Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr
 1775 1780 1785

Ile Ile Cys Ser Glu Thr Ser Asn Val Leu Thr Thr Leu Gly Pro
 1790 1795 1800

Leu Phe His Ser Val Tyr Ile Val Gln Thr Gly Tyr Ser Ser Ser
 1805 1810 1815

Phe Thr Ser Glu Val Tyr Val Leu Phe Ser Lys Gln Lys Ser Phe
 1820 1825 1830

Val Asp Ser Pro Tyr Val Asp Trp Gly Ser Leu Gln Tyr Asn Trp
 1835 1840 1845

Glu Lys Leu Ala Cys Phe Arg Asn Pro Arg Gln Glu Phe Lys Arg
 1850 1855 1860

Ala Leu Arg Ile Arg Ser Ser Arg Ser Leu Met Gly Ile Pro Ser
 1865 1870 1875

Ser Phe Leu Pro Asp Pro Leu Val Asn Leu Glu Thr Leu Leu Gln
 1880 1885 1890

Ile Ser Gly Val Pro Ser Gly Val Ser His Gln Leu Val Thr Asp
 1895 1900 1905

Val Lys Ser Ser Gly Ala Ser Gly Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu
 1910 1915 1920

Leu Gly Leu Ile Ser His Phe Thr Leu Asp Val Thr Lys Leu Tyr
 1925 1930 1935

Val Gln Glu Tyr Arg Pro Pro Ser Asp Asn Arg Leu Ile Lys Met
 1940 1945 1950

Ala Ser Ala Ile Thr Gly Ile Ser Tyr Trp Ile Ser Ile Ala Tyr
 1955 1960 1965

His Asp Gln Gln Leu Asn Gln Ala Leu Thr Ser Val Ile Lys Lys
 1970 1975 1980

ES 2 749 381 T3

Ser Phe Pro Ile Arg Trp Gly Leu Ile Asn His Arg Leu His Trp
1985 1990 1995

Ser Val Ser Asp Arg Phe His Arg Ser Lys Asp Val Arg Leu Ser
2000 2005 2010

Asp Cys Leu Ala Gly Ile Gly Asn Trp Ile Arg Gly Met Glu Leu
2015 2020 2025

Met Lys Leu Pro Ala Gly Met Phe Ser His Lys Glu Val Asn Met
2030 2035 2040

Ile Leu Ser Lys Tyr Ile Arg Gly Leu Asn Tyr His Thr Ile Ser
2045 2050 2055

Ser Arg Thr Gly Ile Leu Glu Ile Leu Lys Ser Gln Phe Ser Ile
2060 2065 2070

Ile Asp Arg Ser Leu Met Thr Ile Thr Thr Asp Asn Ile Gln Ser
2075 2080 2085

Ser Asp Trp Thr Asp
2090

- <210> 7
- <211> 11161
- <212> ADN
- <213> Virus de estomatitis vesicular

- <400> 7

5

ES 2 749 381 T3

acgaagacaa	acaaccatt	attatcatta	aaaggctcag	gagaaacttt	aacagtaatc	60
aaaatgtctg	ttacagtcaa	gagaatcatt	gacaacacag	tcatagttcc	aaaacttcct	120
gcaaatgagg	atccagtgga	ataccggca	gattacttca	gaaaatcaaa	ggagattcct	180
ctttacatca	atactacaaa	aagtttgtca	gatctaagag	gatatgtcta	ccaaggcctc	240
aatccggaa	atgtatcaat	catacatgtc	aacagctact	tgtatggagc	attaaaggac	300
atccggggta	agttggataa	agatttgtca	agtttcggaa	taaacatcgg	gaaagcaggg	360
gatacaatcg	gaatatttga	ccttgtatcc	ttgaaagccc	tggacggcgt	acttccagat	420
ggagtatcgg	atgcttccag	aaccagcgca	gatgacaaat	ggttgccttt	gtatctactt	480
ggcttataca	gagtgggcag	aacacaaatg	cctgaataca	gaaaaaagct	catggatggg	540
ctgacaaatc	aatgcaaaat	gatcaatgaa	cagtttgaac	ctcttgtgcc	agaaggtcgt	600
gacatTTTTg	atgtgtgggg	aatgacagt	aattacacaa	aaattgtcgc	tgcagtggac	660
atgttcttcc	acatgttcaa	aaaacatgaa	tgtgcctcgt	tcagatacgg	aactattgtt	720

ES 2 749 381 T3

tccagattca aagattgtgc tgcattggca acatttggac acctctgcaa aataaccgga 780
atgtctacag aagatgtaac gacctggatc ttgaaccgag aagttgcaga tgaaatggtc 840
caaatgatgc ttccaggcca agaaattgac aaggccgatt catacatgcc ttatttgatc 900
gactttggat tgtcttctaa gtctccatat tcttccgtca aaaaccctgc cttccacttc 960
tgggggcaat tgacagctct tctgctcaga tccaccagag caaggaatgc ccgacagcct 1020
gatgacattg agtatacatc tcttactaca gcaggtttgt tgtacgctta tgcagtagga 1080
tcctctgccg acttggcaca acagttttgt gttggagata acaaatacac tccagatgat 1140
agtaccggag gattgacgac taatgcaccg ccacaaggca gagatgtggt cgaatggctc 1200
ggatggtttg aagatcaaaa cagaaaaccg actcctgata tgatgcagta tgcgaaaaga 1260
gcagtcatgt cactgcaagg cctaagagag aagacaattg gcaagtatgc taagtcagaa 1320
tttgacaaat gaccctataa ttctcagatc acctattata tattatgcta catatgaaaa 1380
aaactaacag atatcatgga taatctcaca aaagttcgtg agtatctcaa gtcctattct 1440
cgtctggatc aggcggtagg agagatagat gagatcgaag cacaacgagc tgaaaagtcc 1500
aattatgagt tgttccaaga ggatggagtg gaagagcata ctaagccctc ttatthtcag 1560
gcagcagatg attctgacac agaatctgaa ccagaaattg aagacaatca aggtttgtat 1620
gcacaggatc cagaagctga gcaagttgaa ggctttatac aggggccttt agatgactat 1680
gcagatgagg aagtggatgt tgtatttact tcggactgga aaccacctga gcttgaatct 1740
gacgagcatg gaaagacctt acggttgaca tcgccagagg gtttaagtgg agagcagaaa 1800
tcccagtggc tttcgacgat taaagcagtc gtgcaaagtg ccaaatactg gaatctggca 1860
gagtgcacat ttgaagcatc gggagaaggg gtcattatga aggagcgcca gataactccg 1920
gatgtatata aggtcactcc agtgatgaac acacatccgt cccaatcaga agcagtatca 1980
gatgtttggt ctctctcaaa gacatccatg actttccaac ccaagaaagc aagtcttcag 2040
cctctcacca tatccttggga tgaattgttc tcatctagag gagagttcat ctctgtcggga 2100
ggtgacggac gaatgtctca taaagaggcc atcctgctcg gcctgagata caaaaagttg 2160
tacaatcagg cgagagtcaa atattctctg tagactatga aaaaaagtaa cagatatcac 2220
gatctaagtg ttatcccaat ccattcatca tgagttcctt aaagaagatt ctcggtctga 2280
aggggaaagg taagaaatct aagaaattag ggatcgcacc acccccttat gaagaggaca 2340
ctagcatgga gtatgctccg agcgctccaa ttgacaaatc ctatthtggga gttgacgaga 2400
tggaacaccta tgatccgaat caattaagat atgagaaatt cttctttaca gtgaaaatga 2460
cggttagatc taatcgtccg ttcagaacat actcagatgt ggcagccgct gtatcccatt 2520
gggatcacat gtacatcgga atggcagga aacgtccctt ctacaaaatc ttggctthtt 2580

ES 2 749 381 T3

tgggttcttc taatctaaag gccactccag cggatttggc agatcaaggt caaccagagt 2640
 atcacactca ctgcgaaggc agggcttatt tgccacatag gatggggaag acccctccca 2700
 tgctcaatgt accagagcac ttcagaagac cattcaatat aggtctttac aagggaacga 2760
 ttgagctcac aatgaccatc tacgatgatg agtcaactgga agcagctcct atgatctggg 2820
 atcatttcaa ttcttccaaa ttttctgatt tcagagagaa ggccttaatg tttggcctga 2880
 ttgtcgagaa aaaggcatct ggagcgtggg tcctggattc tatcagccac ttcaaatgag 2940
 ctagtctaac ttctagcttc tgaacaatcc ccggtttact cagtctctcc taattccagc 3000
 ctctcgaaca actaatatcc tgtcttttct atccctatga aaaaaactaa cagagatcga 3060
 tctgtttcct tgacactatg aagtgccttt tgtacttagc ctttttattc attgggggtga 3120
 attgcaagtt caccatagtt tttccacaca accaaaaagg aaactggaaa aatgttctct 3180
 ctaattacca ttattgcccg tcaagctcag atttaaattg gcataatgac ttaataggca 3240
 cagccataca agtcaaaatg cccaagagtc acaaggctat tcaagcagac ggttggatgt 3300
 gtcagtcttc caaatgggtc actacttggt atttccgctg gtatggaccg aagtatataa 3360
 cacagtccat ccgatccttc actccatctg tagaacaatg caaggaaagc attgaacaaa 3420
 cgaaacaagg aacttgggtg aatccaggct tcctcctca aagttgtgga tatgcaactg 3480
 tgacggatgc ogaagcagtg attgtccagtg tgactcctca ccatgtgctg gttgatgaat 3540
 acacaggaga atggggtgat tcacagttca tcaacggaaa atgcagcaat tacatatgcc 3600
 ccactgtcca taactctaca acctggcatt ctgactataa ggtcaaaggg ctatgtgatt 3660
 ctaacctcat ttccatggac atcaccttct tctcagagga cggagagcta tcatccctgg 3720
 gaaaggaggg cacagggttc agaagtaact actttgctta tgaaactgga ggcaaggcct 3780
 gcaaaatgca atactgcaag cattggggag tcagactccc atcaggtgtc tggttcgaga 3840
 tggctgataa ggatctcttt gctgcagcca gattccctga atgccagaa gggccaagta 3900
 tctctgctcc atctcagacc tcagtggatg taagtctaat tcaggacgtt gagaggatct 3960
 tggattattc cctctgccaa gaaacctgga gcaaaatcag agcgggtctt ccaatctctc 4020
 cagtggatct cagctatctt gtcctaaaa acccaggaac cggtcctgct ttcaccataa 4080
 tcaatggtac cctaaaatac tttgagacca gatacatcag agtcgatatt gctgctccaa 4140
 tcctctcaag aatggctgga atgatcagtg gaactaccac agaaaggga ctgtgggatg 4200
 actgggcacc atatgaagac gtggaaattg gacccaatgg agttctgagg accagttcag 4260
 gatataagtt tcctttatac atgattggac atgggatggt ggactccgat cttcatctta 4320
 gctcaaaggc tcaggtgttc gaacatcctc acattcaaga cgctgcttcg caacttctg 4380
 atgatgagag tttatTTTTT ggtgatactg ggctatccaa aatccaatc gagcttgtag 4440
 aaggttgggt cagtagttgg aaaagctcta ttgcctcttt tttctttatc atagggttaa 4500

ES 2 749 381 T3

tcattggact	attccttggtt	ctccgagttg	gtatccatct	ttgcattaaa	ttaaagcaca	4560
ccaagaaaag	acagatttat	acagacatag	agatgaaccg	acttggaaag	taactcaaat	4620
cctgcacaac	agattcctca	tgtttgacc	aatcaactt	gtgataccat	gctcaaagag	4680
gcctcaatta	tatttgagtt	tttaatTTTT	atgaaaaaaa	ctaacagcaa	tcatggaagt	4740
ccacgatttt	gagaccgacg	agttcaatga	tttcaatgaa	gatgactatg	ccacaagaga	4800
attcctgaat	cccgatgagc	gcatgacgta	cttgaatcat	gctgattaca	atttgaattc	4860
tcctctaatt	agtgatgata	ttgacaattt	gatcaggaaa	ttcaattctc	ttccgattcc	4920
ctcgatgtgg	gatagtaaga	actgggatgg	agttcttgag	atgttaacat	catgtcaagc	4980
caatcccatc	tcaacatctc	agatgcataa	atggatggga	agttggtaa	tgtctgataa	5040
tcatgatgcc	agtcaaggg	atagttttt	acatgaagtg	gacaaagagg	cagaaataac	5100
atttgacgtg	gtggagacct	tcatccgagg	ctggggcaac	aaaccaattg	aatacatcaa	5160
aaaggaaaga	tggactgact	cattcaaaat	tctcgcttat	ttgtgtcaaa	agtttttgg	5220
cttacacaag	ttgacattaa	tcttaaagtc	tgtctctgag	gtggaattgc	tcaacttggc	5280
gaggactttc	aaaggcaaag	tcagaagaag	ttctcatgga	acgaacatat	gcaggattag	5340
ggttcccagc	ttgggtccta	cttttatttc	agaaggatgg	gcttacttca	agaaacttga	5400
tattctaattg	gaccgaaact	ttctgttaat	ggtcaaagat	gtgattatag	ggaggatgca	5460
aacggtgcta	tccatggtat	gtagaataga	caacctgttc	tcagagcaag	acatcttctc	5520
ccttctaaat	atctacagaa	ttggagataa	aattgtggag	aggcagggaa	atTTTTctta	5580
tgacttgatt	aaaatggtgg	aaccgatatg	caacttgaag	ctgatgaaat	tagcaagaga	5640
atcaaggcct	ttagtccac	aattccctca	ttttgaaaat	catatcaaga	cttctgttga	5700
tgaaggggca	aaaattgacc	gaggtataag	attcctccat	gatcagataa	tgagtgtgaa	5760
aacagtggat	ctcacactgg	tgatttatgg	atcgttcaga	cattggggtc	atccttttat	5820
agattattac	actggactag	aaaaattaca	ttcccaagta	accatgaaga	aagatattga	5880
tgtgtcatat	gcaaaagcac	ttgcaagtga	tttagctcgg	attgttctat	ttcaacagtt	5940
caatgatcat	aaaaagtgg	tcgtgaatgg	agacttgctc	cctcatgatc	atccctttaa	6000
aagtcatggt	aaagaaaata	catggcccac	agctgctcaa	gttcaagatt	ttggagataa	6060
atggcatgaa	cttccgctga	ttaaatggtt	tgaaatacc	gacttactag	accatcgat	6120
aatatactct	gacaaaagtc	attcaatgaa	taggtcagag	gtgttgaaac	atgtccgaat	6180
gaatccgaac	actcctatcc	ctagtaaaaa	ggtgttgacg	actatgttgg	acacaaaggc	6240
taccaattgg	aaagaatttc	ttaaagagat	tgatgagaag	ggcttagatg	atgatgatct	6300
aattattggt	cttaaaggaa	aggagaggg	actgaagttg	gcaggtagat	ttttctcct	6360

ES 2 749 381 T3

aatgtcttgg aaattgcgag aatactttgt aattaccgaa tatttgataa agactcattt 6420
cgtccctatg tttaaaggcc tgacaatggc ggacgatcta actgcagtca ttaaaaagat 6480
gttagattcc tcatccggcc aaggattgaa gtcatatgag gcaatttgca tagccaatca 6540
cattgattac gaaaaatgga ataaccacca aaggaagtta tcaaacggcc cagtgttccg 6600
agttatgggc cagttcttag gttatccatc cttaatcgag agaactcatg aattttttga 6660
gaaaagtctt atatactaca atggaagacc agacttgatg cgtgttcaca acaacacact 6720
gatcaattca acctcccaac gagtttgttg gcaaggacaa gaggggtggac tggaaaggtct 6780
acggcaaaaa ggatggacta tcctcaatct actggttatt caaagagagg ctaaaaatcag 6840
aaacactgct gtcaaagtct tggcacaagg tgataatcaa gttatttgca cacagtataa 6900
aacgaagaaa tcgagaaacg ttgtagaatt acaggggtgct ctcaatcaaa tggtttctaa 6960
taatgagaaa attatgactg caatcaaaat agggacaggg aagttaggac ttttgataaa 7020
tgacgatgag actatgcaat ctgcagatta cttgaattat ggaaaaatac cgatttttccg 7080
tggagtgatt agaggggttag agaccaagag atggtcacga gtgacttgtg tcaccaatga 7140
ccaaatacc cactgtgcta atataatgag ctcaagttcc acaaatgctc tcaccgtagc 7200
tcattttgct gagaacccaa tcaatgccat gatacagtac aattattttg ggacatttgc 7260
tagactcttg ttgatgatgc atgatcctgc tcttcgtcaa tcattgtatg aagtccaaga 7320
taagataccg ggcttgcaaca gttctacttt caaatacgcc atgttgtatt tggacccttc 7380
cattggagga gtgtcgggca tgtctttgtc caggtttttg attagagcct tcccagatcc 7440
cgtaacagaa agtctctcat tctggagatt catccatgta catgctcgaa gtgagcatct 7500
gaaggagatg agtgcagtat ttggaaaccc cgagatagcc aagtttcgaa taactcacat 7560
agacaagcta gtagaagatc caacctctct gaacatcgct atgggaatga gtccagcgaa 7620
cttgtaaag actgaggtta aaaaatgctt aatcgaatca agacaaacca tcaggaacca 7680
ggtgattaag gatgcaacca tatatttga tcatgaagag gatcggctca gaagtttctt 7740
atggtcaata aatcctctgt tccttagatt tttaaagtga ttcaaatcag gcactttttt 7800
gggagtcgca gacgggctca tcagtctatt tcaaaattct cgtactattc ggaactcctt 7860
taagaaaaag tatcataggg aattggatga tttgattgtg aggagtgagg tatcctcttt 7920
gacacattta gggaaacttc atttgagaag gggatcatgt aaaatgtgga catgttcagc 7980
tactcatgct gacacattaa gatacaaatc ctggggccgt acagttattg ggacaactgt 8040
accccatcca ttagaaatgt tgggtccaca acatcgaaaa gagactcctt gtgcaccatg 8100
taacacatca gggttcaatt atgtttctgt gcattgtcca gacgggatcc atgacgtctt 8160
tagttcacgg ggaccattgc ctgcttatct aggggtctaaa acatctgaat ctacatctat 8220
tttgacgcct tgggaaaggg aaagcaaagt cccactgatt aaaagagcta cacgtcttag 8280

ES 2 749 381 T3

agatgctatc tcttggtttg ttgaacccga ctctaaacta gcaatgacta tacttttctaa 8340
 catccactct ttaacaggcg aagaatggac caaaaggcag catgggttca aaagaacagg 8400
 gtctgccctt cataggtttt cgacatctcg gatgagccat ggtgggttcg catctcagag 8460
 cactgcagca ttgaccaggt tgatggcaac tacagacacc atgagggatc tgggagatca 8520
 gaatttgcagac tttttattcc aagcaacggt gctctatgct caaattacca cactgttgc 8580
 aagagacgga tggatcacca gttgtacaga tcattatcat attgcctgta agtcctgttt 8640
 gagaccata gaagagatca ccctggactc aagtatggac tacacgcccc cagatgtatc 8700
 ccatgtgctg aagacatgga ggaatgggga aggttcgtgg ggacaagaga taaaacagat 8760
 ctatccttta gaaggaatt ggaagaattt agcacctgct gagcaatcct atcaagtccg 8820
 cagatgtata ggttttctat atggagactt ggcgtataga aaatctactc atgccgagga 8880
 cagttctcta tttcctctat ctatacaagg tcgtattaga ggtcgagggt tcttaaaagg 8940
 gttgctagac ggattaatga gagcaagttg ctgccaagta atacaccgga gaagtctggc 9000
 tcatttgaag aggccggcca acgcagtgta cggaggtttg atttacttga ttgataaatt 9060
 gagtgtatca cctccattcc tttctcttac tagatcagga cctattagag acgaattaga 9120
 aacgattccc cacaagatcc caacctccta tccgacaagc aaccgtgata tgggggtgat 9180
 tgtcagaaat tacttcaaat accaatgccg tctaattgaa aagggaaaat acagatcaca 9240
 ttattcaciaa ttatggttat tctcagatgt cttatccata gacttcattg gaccattctc 9300
 tatttccacc accctcttgc aaatcctata caagccattt ttatctggga aagataagaa 9360
 tgagttgaga gagctggcaa atctttcttc attgctaaga tcaggagagg ggtgggaaga 9420
 catacatgtg aaattcttca ccaaggacat attattgtgt ccagaggaaa tcagacatgc 9480
 ttgcaagttc gggattgcta aggataataa taaagacatg agctatcccc cttggggaag 9540
 ggaatccaga gggacaatta caacaatccc tgtttattat acgaccacc cttacccaaa 9600
 gatgctagag atgcctcaa gaatcaaaa tcccctgctg tccggaatca ggttgggcca 9660
 attaccaact ggcgctcatt ataaaattcg gagtatatta catggaatgg gaatccatta 9720
 cagggacttc ttgagttgtg gagacggctc cggagggatg actgctgcat tactacgaga 9780
 aaatgtgcat agcagaggaa tattcaatag tctgttagaa ttatcagggt cagtcatgcg 9840
 aggcgcctct cctgagcccc ccagtgcctc agaaacttta ggaggagata aatcgagatg 9900
 tgtaaatggt gaaacatggt gggaaatcc atctgactta tgtgaccaa ggacttggga 9960
 ctatttctc cgactcaaag caggcttggg gcttcaaatt gatttaattg taatggatat 10020
 ggaagttcgg gattcttcta ctagcctgaa aattgagacg aatgttagaa attatgtgca 10080
 ccggatthttg gatgagcaag gagthttaat ctacaagact tatggaacat atatttgtga 10140

ES 2 749 381 T3

gagcgaaaag aatgcagtaa caatccttgg tcccatgttc aagacggtcg acttagttca 10200
aacagaatth agtagttctc aaacgtctga agtatatatg gtatgtaaag gtttgaagaa 10260
attaatcgat gaaccaatc cggattggtc ttccatcaat gaatcctgga aaaacctgta 10320
cgcattccag tcatcagaac aggaatttgc cagagcaaag aaggttagta catactttac 10380
cttgacaggt attccctccc aattcattcc tgatcctttt gtaaaccattg agactatgct 10440
acaaatattc ggagtagcca cgggtgtgtc tcatgaggct gccttaaaat catctgatag 10500
acctgcagat ttattgacca ttagcctttt ttatatggcg attatatcgt attataacat 10560
caatcatatc agagtaggac cgatacctcc gaacccccca tcagatggaa ttgcacaaaa 10620
tgtggggatc gctataactg gtataagctt ttggctgagt ttgatggaga aagacattcc 10680
actatatcaa cagtgtttag cagttatcca gcaatcattc cggattaggt gggaggctgt 10740
ttcagtaaaa ggaggatata agcagaagtg gagtactaga ggtgatgggc tccccaaaaga 10800
taccggaact tcagactcct tggccccaat cgggaactgg atcagatctc tgggaattgt 10860
ccgaaaccaa gttcgtctaa atccattcaa tgagatcttg ttcaatcagc tatgtcgtac 10920
agtgataat catttgaaat ggtcaaattt gcgaagaaac acaggaatga ttgaatggat 10980
caatagacga atttcaaaag aagaccggtc tatactgatg ttgaagagtg acctacacga 11040
ggaaaactct tggagagatt aaaaaatcat gaggagactc caaactttaa gtatgaaaaa 11100
aactttgatc cttaagacct tcttgtggtt tttatthttt atctggthtt gtggtcttcg 11160
t 11161

- <210> 8
- <211> 422
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de estomatitis vesicular
- <400> 8

ES 2 749 381 T3

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

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

Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu 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 Val
50 55 60

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

ES 2 749 381 T3

Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly
 85 90 95
 Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala
 100 105 110
 Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser
 115 120 125
 Ala Asp Asp Lys 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
 Thr Asn Gln Cys Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro
 165 170 175
 Glu Gly Arg Asp Ile 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 Cys 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 Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp Lys Ala Asp
 260 265 270
 Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser Ser Lys Ser Pro
 275 280 285
 Tyr Ser 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

ES 2 749 381 T3

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

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

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

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

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

Lys Ser Glu Phe Asp Lys
 420

<210> 9
 <211> 265
 5 <212> PRT
 <213> Virus de estomatitis vesicular
 <400> 9

Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys Ser Tyr Ser Arg
 1 5 10 15

Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu Ala Gln Arg Ala
 20 25 30

Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly Val Glu Glu His
 35 40 45

Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser Asp Thr Glu Ser
 50 55 60

Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala Gln Asp Pro Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu Asp Asp Tyr Ala
 85 90 95

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

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

10

ES 2 749 381 T3

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

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

Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln Ile Thr Pro Asp
 165 170 175

Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro Ser Gln Ser Glu
 180 185 190

Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser Met Thr Phe Gln
 195 200 205

Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser Leu Asp Glu Leu
 210 215 220

Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly Asp Gly Arg Met
 225 230 235 240

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

Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu
 260 265

5 <210> 10
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Virus de estomatitis vesicular

10 <400> 10

ES 2 749 381 T3

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

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

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

Asp Glu Met Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

Pro Phe Asn Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr
165 170 175

Ile Tyr Asp Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His
180 185 190

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

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

Ile Ser His Phe Lys
225

ES 2 749 381 T3

<210> 11
<211> 511
<212> PRT
<213> Virus de estomatitis vesicular

5

<400> 11

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

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

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

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

ES 2 749 381 T3

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
 65 70 75 80
 Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln
 85 90 95
 Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
 100 105 110
 Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
 115 120 125
 Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln
 130 135 140
 Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
 145 150 155 160
 Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
 165 170 175
 Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
 180 185 190
 Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
 195 200 205
 Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
 210 215 220
 Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
 225 230 235 240
 Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
 245 250 255
 Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu 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 Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr

ES 2 749 381 T3

Met Glu Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu Phe Asn Asp Phe Asn Glu
1 5 10 15

Asp Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr

ES 2 749 381 T3

Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys Met
 275 280 285
 Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Ser
 290 295 300
 Arg Pro Leu Val Pro Gln Phe Pro His Phe Glu Asn His Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 Ser Val Asp Glu Gly Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile Arg Phe Leu His
 325 330 335
 Asp Gln Ile Met Ser Val Lys Thr Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr
 340 345 350
 Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly
 355 360 365
 Leu Glu Lys Leu His Ser Gln Val Thr Met Lys Lys Asp Ile Asp Val
 370 375 380
 Ser Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe
 385 390 395 400
 Gln Gln Phe Asn Asp His Lys Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu Leu
 405 410 415
 Pro His Asp His Pro Phe Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr Trp Pro
 420 425 430
 Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His Glu 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 Lys His
 465 470 475 480
 Val Arg Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln
 485 490 495
 Thr Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu
 500 505 510
 Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys
 515 520 525

ES 2 749 381 T3

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 Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu
 565 570 575

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

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

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

Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Ser 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 His Asn Asn Thr Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg Val Cys
 660 665 670

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

Thr 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 Val Val Glu Leu Gln Gly Ala
 725 730 735

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

Ile Gly Thr Gly 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 Ile Pro Ile Phe Arg Gly
 770 775 780

ES 2 749 381 T3

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 Ile Asn Ala
820 825 830

Met 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 Gln Ser Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys
850 855 860

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

Phe Ile His Val His Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu Met Ser Ala
915 920 925

Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile Thr His Ile 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 Ile Glu Ser
965 970 975

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

Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro
995 1000 1005

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

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

ES 2 749 381 T3

1025						1030						1035			
Ile Arg	Asn Ser	Phe Lys	Lys Lys	Lys Tyr	His Arg	Glu Leu	Asp Asp								
1040			1045			1050									
Leu Ile	Val Arg	Ser Glu	Val Ser	Ser Ser	Leu Thr	His Leu	Gly Lys								
1055			1060			1065									
Leu His	Leu Arg	Arg Gly	Ser Cys	Lys Met	Trp Thr	Cys Ser	Ala								
1070			1075			1080									
Thr His	Ala Asp	Thr Leu	Arg Tyr	Lys Ser	Trp Gly	Arg Thr	Val								
1085			1090			1095									
Ile Gly	Thr Thr	Val Pro	His Pro	Leu Glu	Met Leu	Gly Pro	Gln								
1100			1105			1110									
His Arg	Lys Glu	Thr Pro	Cys Ala	Pro Cys	Asn Thr	Ser Gly	Phe								
1115			1120			1125									
Asn Tyr	Val Ser	Val His	Cys Pro	Asp Gly	Ile His	Asp Val	Phe								
1130			1135			1140									
Ser 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	Glu Pro	Asp Ser	Lys Leu	Ala Met	Thr Ile	Leu Ser	Asn								
1190			1195			1200									
Ile His	Ser Leu	Thr Gly	Glu Glu	Trp Thr	Lys Arg	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 Asp	Gln								
1250			1255			1260									

ES 2 749 381 T3

Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile
 1265 1270 1275
 Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr Asp
 1280 1285 1290
 His Tyr His Ile Ala Cys Lys Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu Glu
 1295 1300 1305
 Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val Ser
 1310 1315 1320
 His Val Leu Lys Thr Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly Gln
 1325 1330 1335
 Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn Leu
 1340 1345 1350
 Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe
 1355 1360 1365
 Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Thr His Ala Glu Asp
 1370 1375 1380
 Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly Arg
 1385 1390 1395
 Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu 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 Val Ser Pro Pro Phe Leu Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro Ile
 1445 1450 1455
 Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile 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 Ile Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser His
 1490 1495 1500

ES 2 749 381 T3

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

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

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

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

 Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly Thr
 1595 1600 1605

 Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro Lys
 1610 1615 1620

 Met Leu Glu Met Pro Pro Arg Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser Gly
 1625 1630 1635

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

 Ser Ile Leu His Gly Met Gly Ile His 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 Val His Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Ser
 1685 1690 1695

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

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

 Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp Asp
 1730 1735 1740

ES 2 749 381 T3

Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp Leu
 1745 1750 1755
 Ile Val Met Asp Met Glu Val Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu Lys
 1760 1765 1770
 Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn Tyr Val His Arg Ile Leu Asp Glu
 1775 1780 1785
 Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys Glu
 1790 1795 1800
 Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys Thr
 1805 1810 1815
 Val Asp Leu Val Gln Thr Glu Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu
 1820 1825 1830
 Val Tyr Met Val Cys Lys Gly Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu Pro
 1835 1840 1845
 Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu Tyr
 1850 1855 1860
 Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys Val
 1865 1870 1875
 Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile Pro
 1880 1885 1890
 Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly Val
 1895 1900 1905
 Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp Arg
 1910 1915 1920
 Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile Ile
 1925 1930 1935
 Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro Pro
 1940 1945 1950
 Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala Ile
 1955 1960 1965
 Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile Pro

ES 2 749 381 T3

1970		1975		1980
Leu Tyr 1985	Gln Gln Cys	Leu Ala 1990	Val Ile Gln Gln	Ser Phe Pro Ile 1995
Arg Trp 2000	Glu Ala Val	Ser Val 2005	Lys Gly Gly Tyr	Lys Gln Lys Trp 2010
Ser Thr 2015	Arg Gly Asp	Gly Leu 2020	Pro Lys Asp Thr	Arg Thr Ser Asp 2025
Ser Leu 2030	Ala Pro Ile	Gly Asn 2035	Trp Ile Arg Ser	Leu Glu Leu Val 2040
Arg Asn 2045	Gln Val Arg	Leu Asn 2050	Pro Phe Asn Glu	Ile Leu Phe Asn 2055
Gln Leu 2060	Cys Arg Thr	Val Asp 2065	Asn His Leu Lys	Trp Ser Asn Leu 2070
Arg Arg 2075	Asn Thr Gly	Met Ile 2080	Glu Trp Ile Asn	Arg Arg Ile Ser 2085
Lys Glu 2090	Asp Arg Ser	Ile Leu 2095	Met Leu Lys Ser	Asp Leu His Glu 2100
Glu Asn 2105	Ser Trp Arg	Asp		

5 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 13
 gtgcgtggaa gaccggtacc tccatttg 30

15 <210> 14
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
 taatgtatt gccggcgaat tcgaaactga ataaatc 37

25 <210> 15
 <211> 35
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 15 aataacatta ctcgagttcg gtacctcca ttgg	35
	<210> 16	
10	<211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16 caactttaa ttcgaaactg aataaatcta tc	32
	<210> 17	
20	<211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 17 taatacgact cactatagg	19
30	<210> 18 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 18 acggagaaaa acaaaccaat tcacgc	26
40	<210> 19 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 19 ttgagcacct ggtacagga tgaattgatg tgacac	36
	<210> 20	
55	<211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 20	

	gcgtgaattg gtttgTTTT ctccgtccta tagtgagtcg tattagccgg cctcgagtaa	60
	attaatt	67
5	<210> 21 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 21 ttgagcacct ggtacagga tgaattgatg tgacac	36
15	<210> 22 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 22 cgtattagcc ggcctcgagt aaattaatt	29
25	<210> 23 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 23 aatctggacg cgtctcgcta gtcaggctga ttattgagg	40
40	<210> 24 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 24 ttgatatttc cccaactcta c	21
50	<210> 25 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 25 cgcatgccgt ctcttatgt tgattg	26
60	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 749 381 T3

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 26 agcattcatt ataagatga c	21
10	<210> 27 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 27 gcttttcaca gatgaagcta gctgaaagta tgaaaaaac g	41
20	<210> 28 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 28 gttttttca tacttcagc tagcttcac tggaaaagc ttg	43
30	<210> 29 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 29 aacagaggtc aaacgcgtgt caaatgact tcagtttat tcatg	45
40	<210> 30 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 30 gaataaaact gaagtcatt tgacacgctg ttgacctctg ttaat	45
50	<210> 31 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 31	
	cagctggcgg ccgctaggaa ttcaaatcaa catatatgaa aaaaatcaac agagatacaa	60
	caatg	65

ES 2 749 381 T3

	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 32	
10	acatagtggc attggaaca g	21
	<210> 33	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 33	
20	cgcatgccgt ctccttatgt tgattg	26
	<210> 34	
	<211> 55	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 34	
	agtcataccg gtctcgtaa ttttttcat atctttctc tgcattgat aattc	55
	<210> 35	
35	<211> 54	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 35	
	tcgagaacgc gttgacctc tgtaatttt tttcatatat gttgattga attc	54
45	<210> 36	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 36	
55	attccaacgc gtctcgtaa caggatcaa aatgacttct gtagtaaag	49
	<210> 37	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 37	
65	gctttcaca gatgaagcta gcgcatgagg cgcgtgaaag tatgaaaaa acg	53

ES 2 749 381 T3

<210> 38
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 38
 10 gttttttca tacttcagc ggccgcatgc gctagctca tctgtgaaaa gcttg 55
 <210> 39
 <211> 79
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 39
 ctagctgaaa gtatgaaaa aattaacaga ggtcaaactc gaggatatcg gtaccgaagg 60
 cgcgcccagc tgtgcggcc 79
 <210> 40
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 40
 ggccgcacag ctgggcgcgc cttcgggtacc gatatacctcg agtttgacct ctgttaattt 60
 ttttcataact ttcag 75
 35
 <210> 41
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 41
 45 gaattcctcg agttgacctc tgtaatttt tttcatatat gttgattga attc 54
 <210> 42
 <211> 57
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 42
 gatgaagcta gctgaaagta tgaaaaaaat taacagggat caaatgact tctgtag 57
 <210> 43
 <211> 21

ES 2 749 381 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 43	
	atcattcctt tattgtcag c	21
10	<210> 44	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 44	
20	tatatggcta gcgaagacag agggatcaaa atgtctcgac tcaaccaaat	50
	<210> 45	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 45	
30	ctagcccggc taatcgcact cactatagga cggagaaaaa caaa	44
	<210> 46	
	<211> 45	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 46	
40	ttggttgtt ttctccgtc ctatagtgag tcgtattagc cggcg	45
	<210> 47	
	<211> 40	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 47	
	ccaattcacg cattagaaga ttccagagga aagtgctaac	40
	<210> 48	
55	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 48	
	ccctgtagc acttctct ggaatctct aatgcgtgaa	40
65	<210> 49	
	<211> 71	

ES 2 749 381 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 49

gaaagacaag aagtgaccca gagcgattcc tacatgcctt acatgattga tatggggatc 60
tcaaccaaat c 71
 10
 <210> 50
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 50
 20
ggttgagatc cccatatcaa tcatgtaagg catgtaggaa tcgctctggt ccacttcttg 60

tctttctttc 70
 <210> 51
 <211> 117
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 30
 <400> 51

ES 2 749 381 T3

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

Lys Glu Glu Glu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys Glu
20 25 30

Glu Glu Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly
35 40 45

Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Gly Gly His Gln Ala Ala
50 55 60

Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Ile Leu Lys
65 70 75 80

Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln
85 90 95

Gly Val Gly Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Pro Gly His
100 105 110

Lys Ala Arg Val Leu
115

<210> 52
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polipéptido sintético
<400> 52

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

15 <210> 53
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53
25 tttttgcta gcttcacctg cataatagtg gcaac 35

<210> 54
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

ES 2 749 381 T3

<400> 54
aacagaggtc aaacgcgtgt caaaatgact tcagtttat tcatg 45

5 <210> 55
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 55
gtgCGtatga aaaaaacgaa tcaacagagt tcatcatgga tgagtactct gaagaaaagt 60

15 **ggggcGattc 70**

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido sintético

25 <400> 56

Met Asp Glu Tyr Ser Glu Glu Lys Trp Gly Asp
1 5 10

30 <210> 57
<211> 137
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 57
gtgcaggTga gctagccgcc tagccagatt ctatgTttgg accaaatcaa cttgtgatac 60

catgctcaaa gaggcctcat tatatttgag tttttaattt ttatgaaaaa aacgaatcaa 120

cagagttcat catggat 137

40 <210> 58
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 58
50 ctattatgCG tatgcgagac gcgtctcGta tgaaaaaaac gaatcaacag ag 52

<210> 59
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

ES 2 749 381 T3

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 59 ctgttgattc gttttttca tacgagacgc gtctcgcata cgcataatag tg	52
10	<210> 60 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 60 aattaacgtc tcagagattg cagcgaaccc cagtgcggct gctgtttctt tc	52
20	<210> 61 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 61 aacagaggtc aaacgcgtgt caaaatgact tcagttttat tcatg	45
30	<210> 62 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 62 tctctgtgat cctgatcatc ggactgatga ggctgctgcc actactgtgc aggtgag	57
45	<210> 63 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 63 ctagctcacc tgcacagtag tggcagcagc ctcatcagtc cgatgatcag gatcaca	57
55	<210> 64 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 64 ctaggcgcgt ctcgcatacg cacagtagtg gcag	34
65	<210> 65 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 65
 aacagaggtc aaacgcgtgt caaaatgact tcagttttat tcatg 45

<210> 66
 <211> 42
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 66
 tgttagcgtc tctcataaaa attaaaaact caaatataat tg 42

<210> 67
 <211> 45
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 67
 aacagaggtc aaacgcgtgt caaaatgact tcagttttat tcatg 45

<210> 68
 <211> 18
 30 <212> PRT
 <213> Virus Thosea asigna

35 <400> 68

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Pro

<210> 69
 <211> 37
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

45 <400> 69
 gggcccactc gagaacatga gcctggccat ccccgtg 37

<210> 70
 <211> 37
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

55 <400> 70
 gggcccagct agcggccgct tagtgcctgc tgaagct 37

60

REIVINDICACIONES

1. Un virus Isfahan competente en replicación, recombinante que comprende un gen de proteína N que codifica una proteína N que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, un gen de proteína P que codifica una proteína P que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, un gen de proteína M que codifica una proteína M que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, un gen de proteína G que codifica una proteína G que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y un gen de proteína L que codifica una proteína L que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90, 95, 98 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y que comprende además una secuencia polinucleotídica heteróloga que codifica un polipéptido heterólogo.
2. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que la secuencia polinucleotídica heteróloga está flanqueada por una señal de inicio de la transcripción y una señal de parada de la transcripción.
3. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido heterólogo codifica un polipéptido inmunogénico.
4. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido heterólogo codifica uno o más antígenos, preferentemente el antígeno es un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno específico de tumor o cáncer, un antígeno parásito o un alérgeno.
5. El virus Isfahan de la reivindicación 4, en el que el antígeno es un antígeno vírico.
6. El virus Isfahan de la reivindicación 5, en el que el antígeno vírico es del virus Chikungunya.
7. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que la secuencia polinucleotídica heteróloga se ubica en la posición 1, 2, 3, 4, 5 o 6 del genoma del virus Isfahan.
8. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que el gen de la proteína N se ubica en la posición 1, 2, 3, 4 o 5 del genoma del virus Isfahan.
9. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que el gen de la proteína G codifica una proteína G que tiene un truncamiento carboxiterminal, preferentemente, la proteína G tiene un truncamiento carboxiterminal de 20 a 25 aminoácidos.
10. El virus Isfahan de la reivindicación 1, en el que la secuencia polinucleotídica heteróloga se ubica en la posición 5 y el gen de la proteína N se ubica en la posición 4 del genoma del virus Isfahan.
11. Una célula huésped que comprende el virus Isfahan de la reivindicación 1.
12. Una composición inmunogénica que comprende un virus Isfahan competente en replicación, recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición inmunogénica que comprende un virus Isfahan competente en replicación, recombinante de la reivindicación 12, para su uso en la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno a un antígeno en un sujeto mamífero que comprende administrar la composición inmunogénica de la reivindicación 12.
14. Un kit de inmunización de sensibilización-refuerzo para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho kit:
- (a) una composición de Isfahan que comprende un virus Isfahan competente en replicación recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y
 - (b) una composición de virus de estomatitis vesicular que comprende un virus de estomatitis vesicular competente en replicación recombinante que codifica un gen de proteína N, un gen de proteína P, un gen de proteína M, un gen de proteína G, un gen de proteína L y una secuencia polinucleotídica heteróloga, en la que dicha secuencia polinucleotídica heteróloga (i) está flanqueada por una señal de inicio de la transcripción y una señal de parada de la transcripción, y (ii) codifica un polipéptido heterólogo; y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y
 - (c) instrucciones para la administración de la composición de Isfahan antes o después de la composición del virus de la estomatitis vesicular.
15. Las composiciones inmunogénicas de la reivindicación 14, para su uso en la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno en un sujeto mamífero que comprende administrar las composiciones inmunogénicas de la reivindicación 14 en un régimen de sensibilización-refuerzo en el que la composición de Isfahan se administra antes o después de la composición del virus de la estomatitis vesicular.

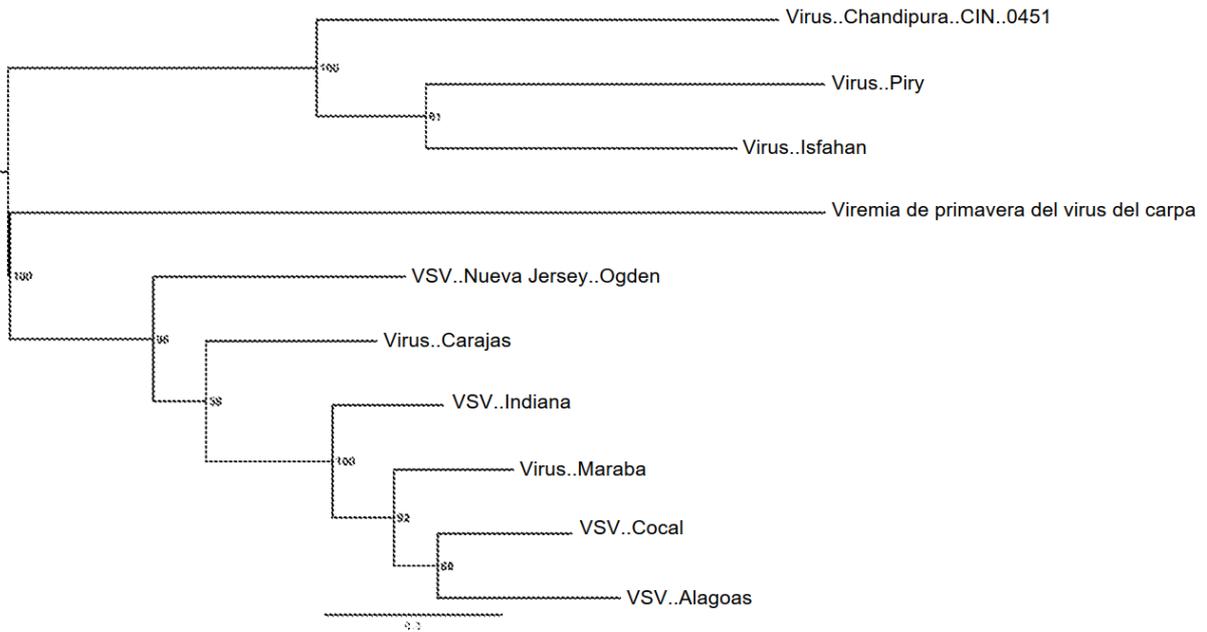


FIG. 1

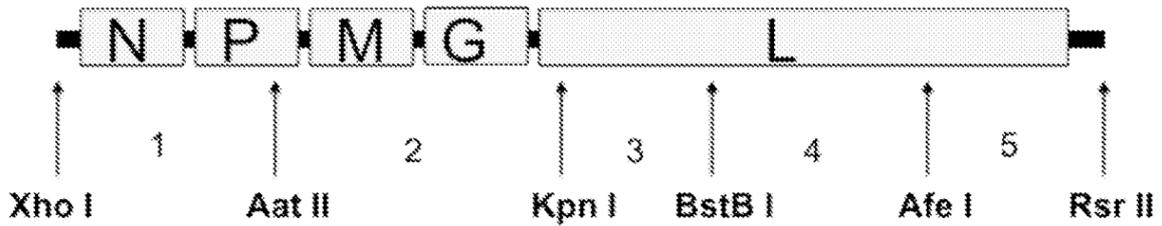


FIG. 2

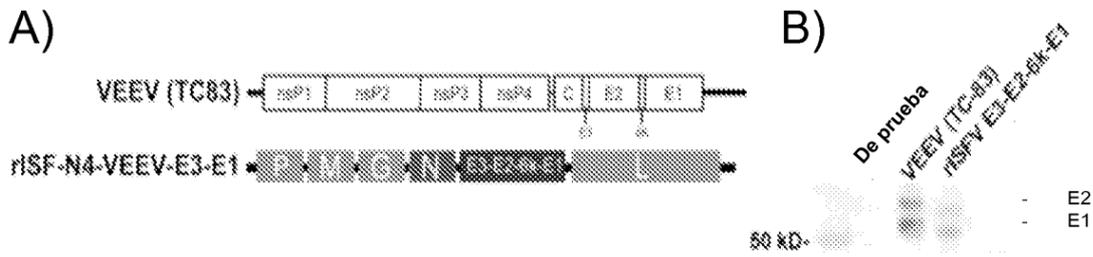


FIG. 3A-3B

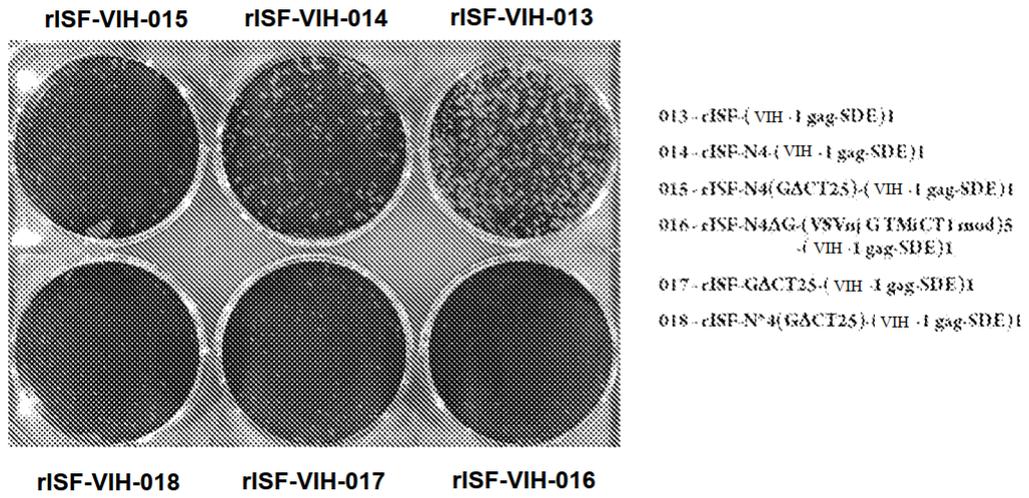


FIG. 5

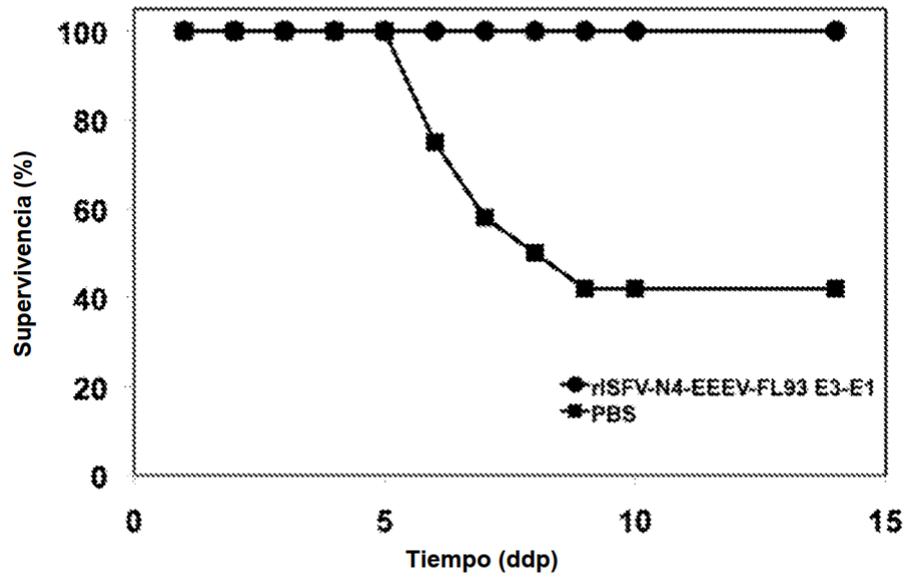


FIG. 6

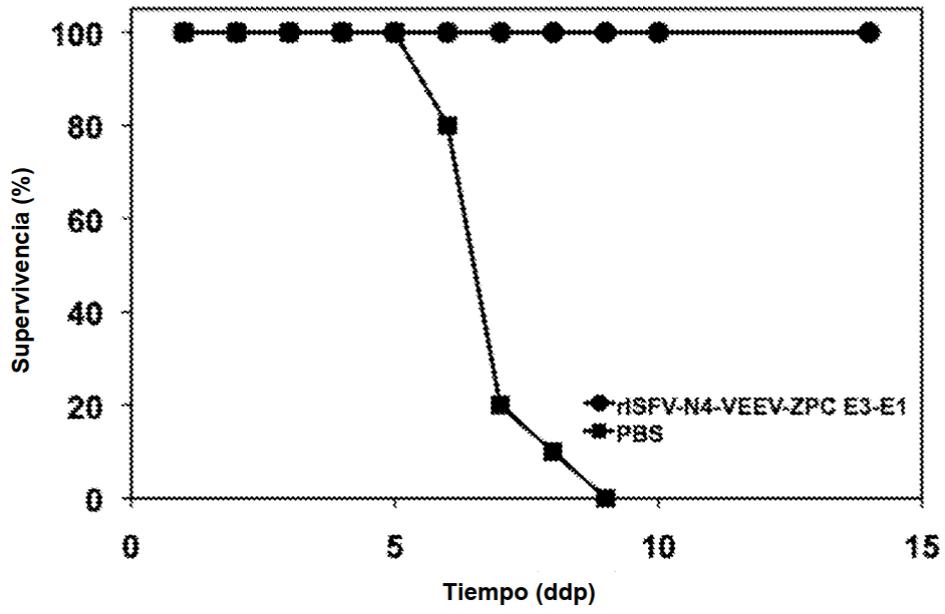


FIG. 7

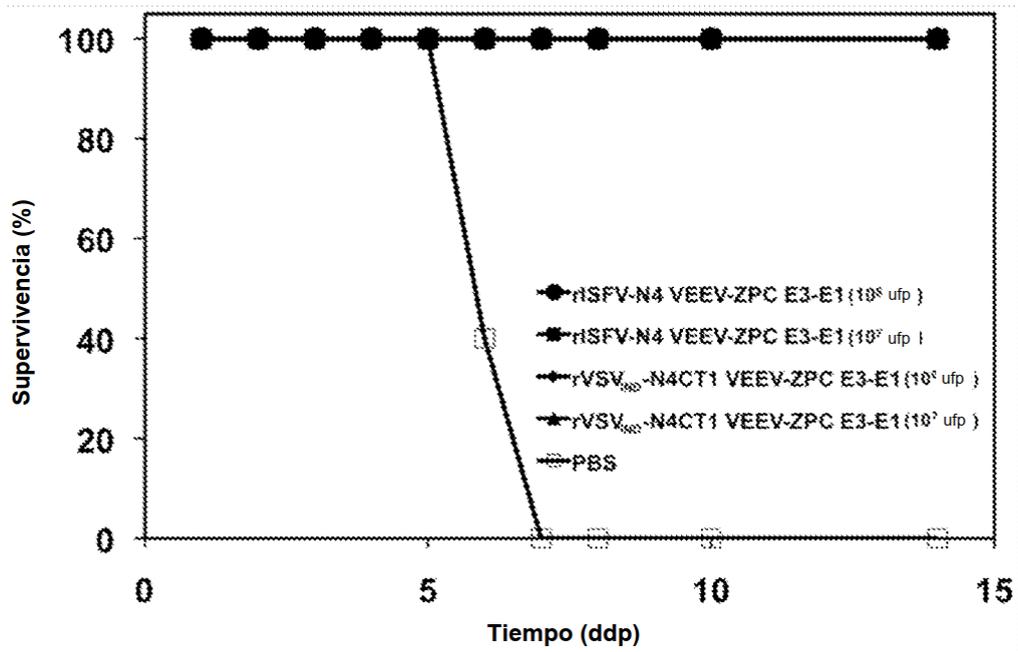


FIG. 8

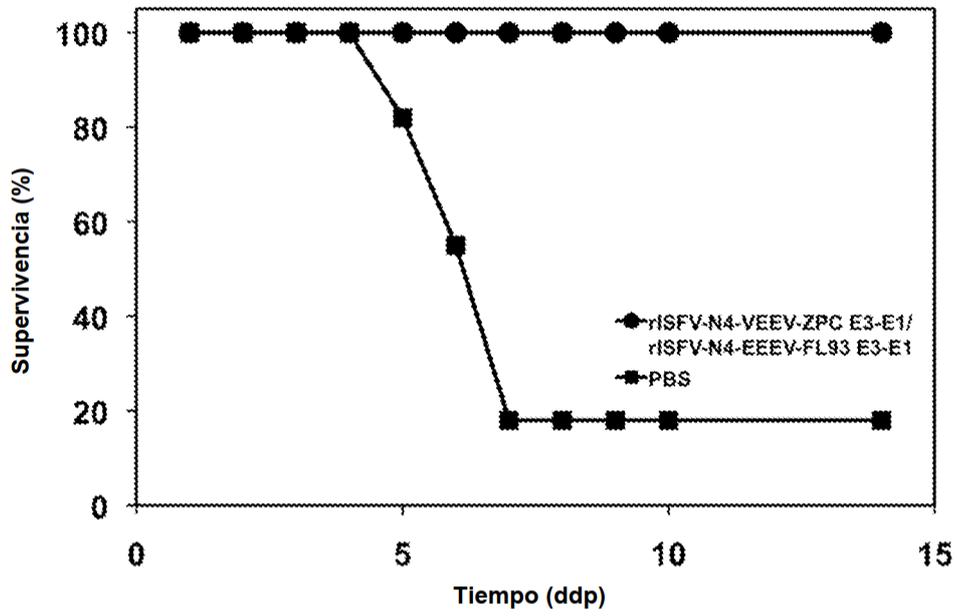


FIG. 9

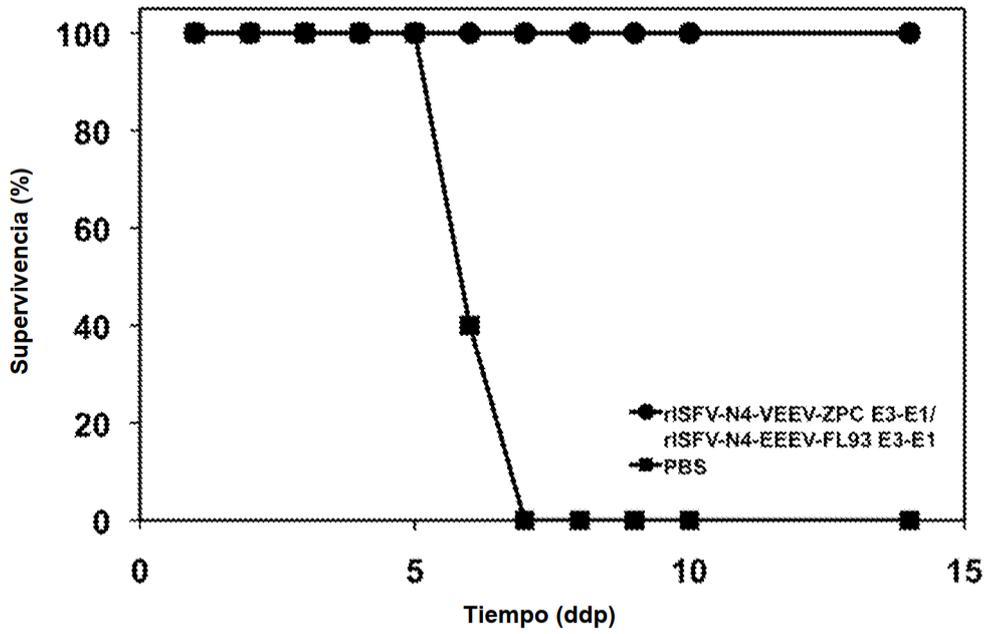


FIG. 10

Chandipura N	...mmtpgqeid q adsympylid m glstkspysstkn...
Piry N	...mmtpgqeidkadsympylidfglstkspysvkn...
Cocal N	...mmypgqeidk s dsympylidfglsqkspystvkn...
VSV Alagoas N	...mmkpgqeidk a dsympylidfglsqkspystvkn...
Viremia de primavera	...mmkpgqeidk s tsympylid m gisakspystikn...
Vesiculo Pike Fr	...mmkpgqeidngasympylid m gisakspystikn...
VSVnj N	...mmypgqeidkadsympy m idfglsqkspysvkn...
VSVi N	...mmalpgeidkadsympylidfglskspysvkn...
ISF N	...mmakerqevdkadsympylidfgistkspysvkn...

ISF N*	...mmakerqevd q sdsympy m i d m gistkspysvkn...			
	<table border="0"> <tr> <td style="padding-right: 40px;">q</td> <td style="padding-right: 40px;">m</td> <td>m</td> </tr> </table>	q	m	m
q	m	m		

FIG. 11

rVSVin N4CT1 (VIH gag-SDE)1 = rVSV-VIH-106

VIH gag SDE



rISF-N4ΔG-(VSVnj G TMiCT1 mod)5-VIH-1 gag-SDE)1 = rISF-VIH-016

VIH gag SDE



rISF-N*4GΔCT25-(VIH-1 gag-SDE)1 = rISF-VIH-018

VIH gag SDE



N*: La proteína N ISF es una forma ligeramente modificada de la proteína Isfahan de tipo silvestre: se ha cambiado un fuerte epítipo de linfocitos T para ratones (K271Q, A272S, L279M, F262M).

FIG. 12

Grupo n.º	N.º de ratones	Vacuna	Dosis de vacuna	Vía
1	5	rVSV _N -N4CT1 (VIH _{gag} -SDE)1 (rVSV-VIH-106)	10 ⁷ ufp	IM
2	5	rISF-N4ΔG-(VSV _N -G-TMCT1 mod)5-(VIH-1 gag-SDE)1 (rVSV-VIH-016)	10 ⁷ ufp	IM
3	5	rISF-N*4GΔCT25-(VIH _{gag} -SDE)1 (rVSV-VIH-018)	10 ⁷ ufp	IM

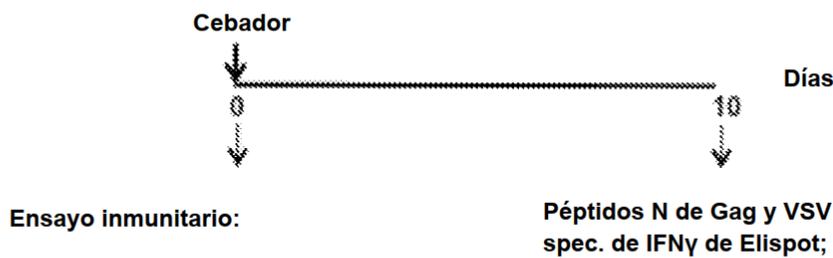
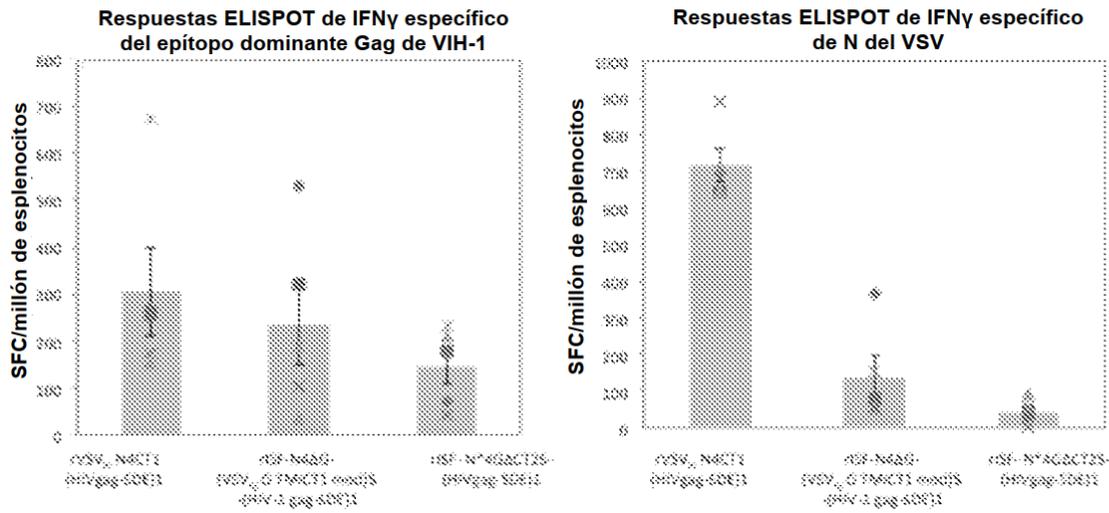


FIG. 13



Conclusión: 1) los dos candidatos rISF obtuvieron un CMI específico de Ac similar, ligeramente inferior al de rVSV.
 2) la mutación rISF N* reduce las respuestas cruzadas a rVSV N. Puede beneficiar el cebado/refuerzo.
 Se prueba además en Mu062b.

FIG. 14

rISF-N*4GΔCT25-(VIH-1 gag-SDE)1 = rISF-VIH-015

VIH gag SDE



rISF-N*4GΔCT25-(VIH-1 gag-SDE)1 = rISF-VIH-018

VIH gag SDE



FIG. 15

Grupo n.º	N.º de ratones	Vacuna de sensibilización	Dosis de vacuna	Vacuna de refuerzo	Dosis de vacuna	Vía
1	5	N/A	N/A	rVSV _{wt} /NACT1 (gag-SDE)1 (rVSV-33V-338)	10 ⁶ ufp	I.M.
2	5	rVSV _{wt} /NACT1 (gag-SDE)1 (rVSV-33V-338)	10 ⁶ ufp	rVSV _{wt} /NACT1 (gag-SDE)1 (rVSV-33V-338)	10 ⁶ ufp	I.M.
3	5	rISF-N*4GΔCT25-(gag-SDE)1 (rISF-33V-338)	10 ⁶ ufp	rVSV _{wt} /NACT1 (gag-SDE)1 (rVSV-33V-338)	10 ⁶ ufp	I.M.
4	5	rVSV _{wt} /NACT1 (gag-SDE)1 (rVSV-33V-338)	10 ⁶ ufp	rISF-N*4GΔCT25-(gag-SDE)1 (rISF-33V-338)	10 ⁶ ufp	I.M.
5	5	rISF-N*4GΔCT25-(gag-SDE)1 (rISF-33V-338)	10 ⁶ ufp	rVSV _{wt} /NACT1 (gag-SDE)1 (rVSV-33V-338)	10 ⁶ ufp	I.M.

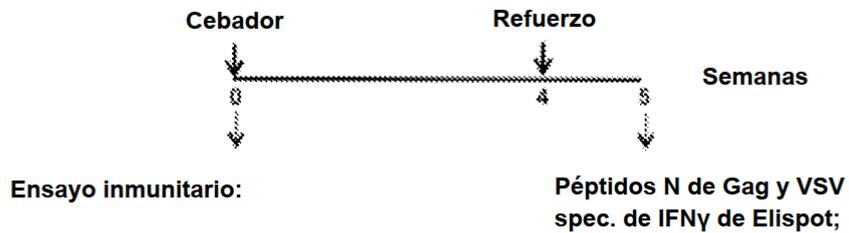


FIG. 16

Respuestas ELISPOT de IFN γ específico de N en VSV

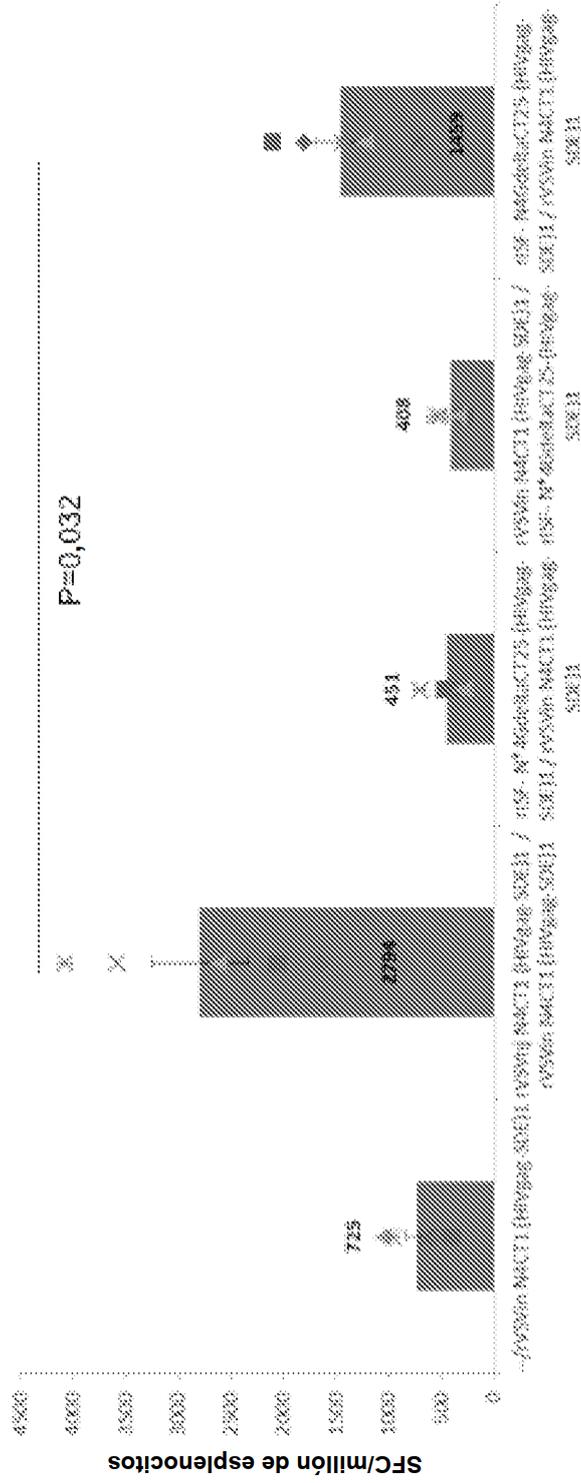


FIG. 18

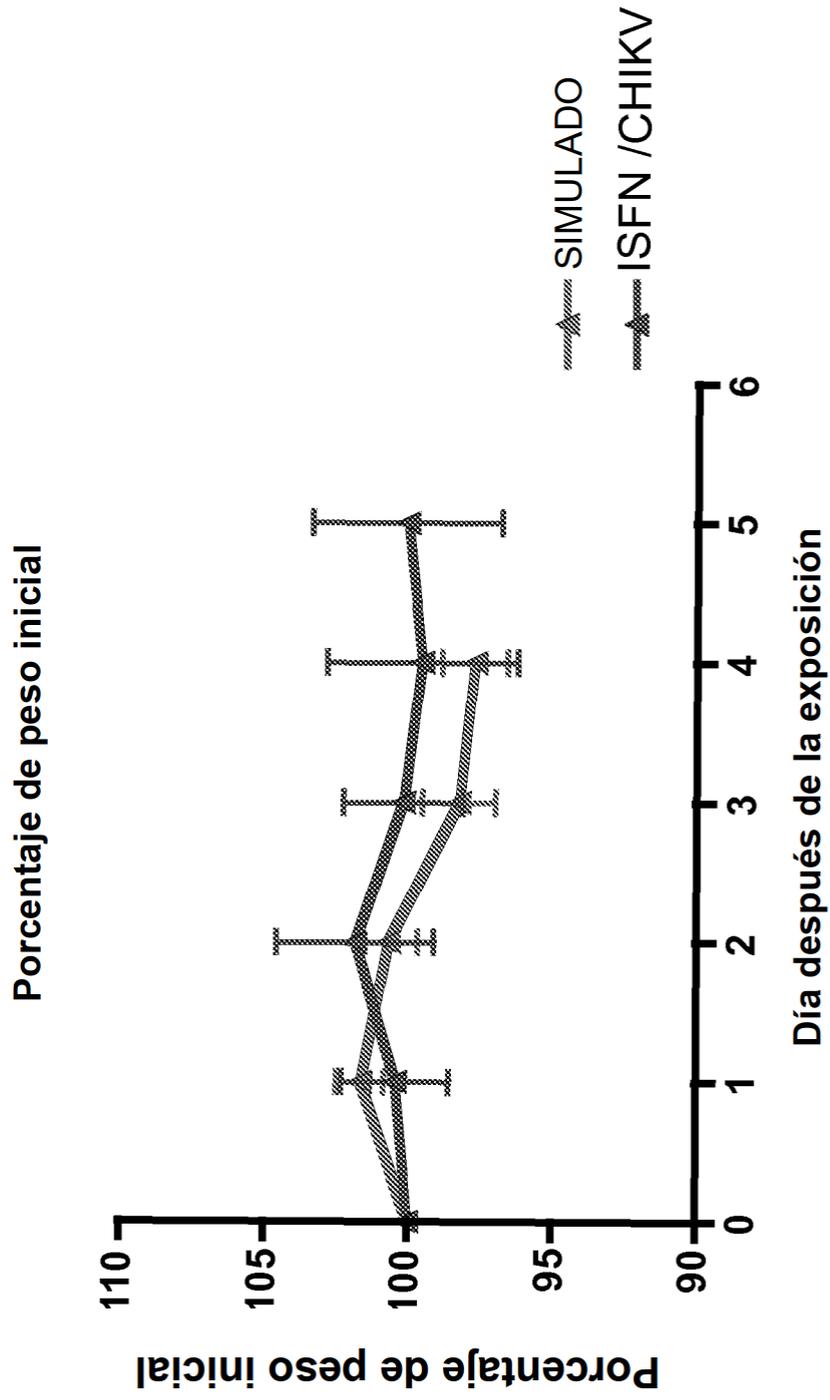


FIG. 19

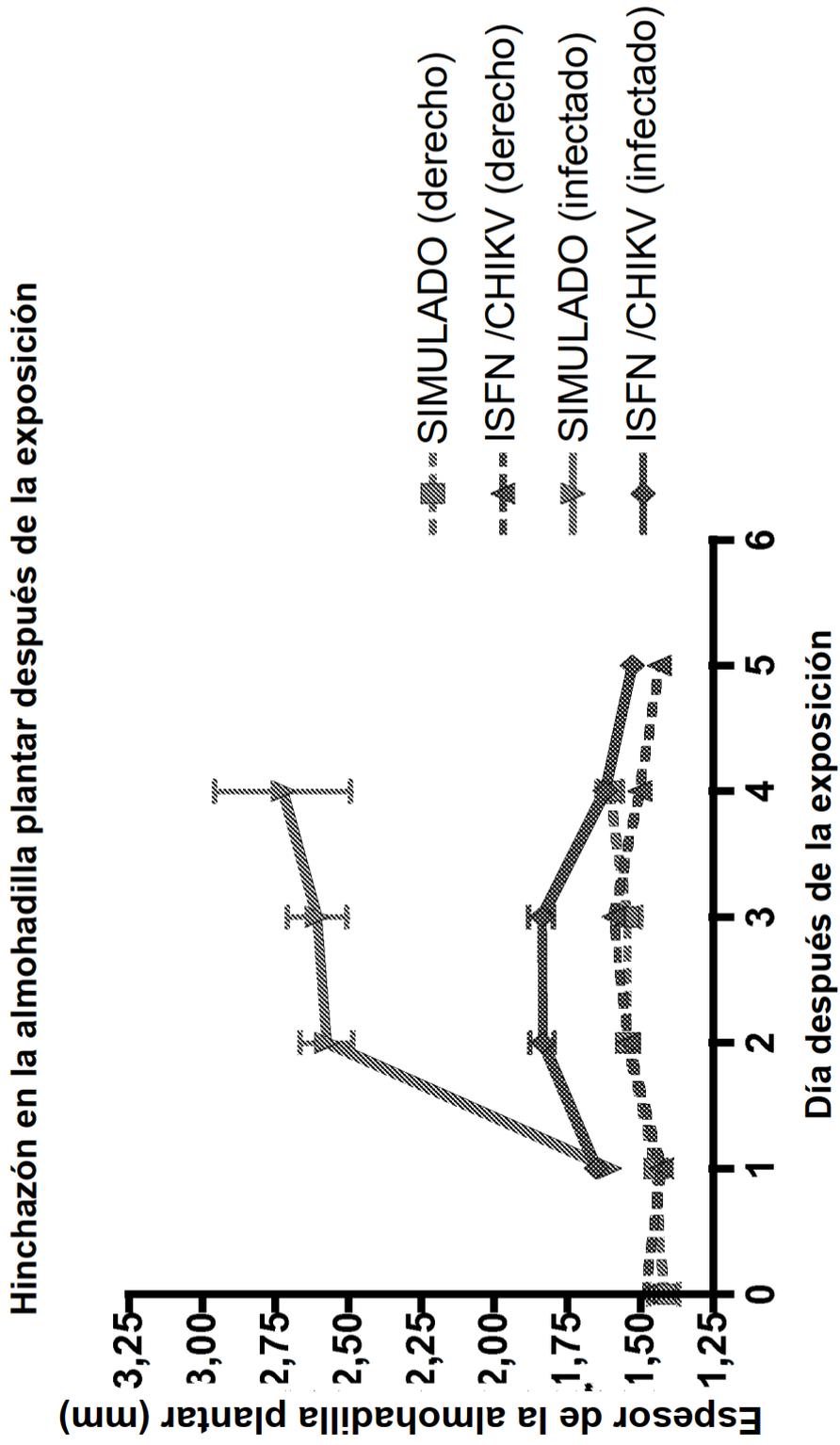


FIG. 20

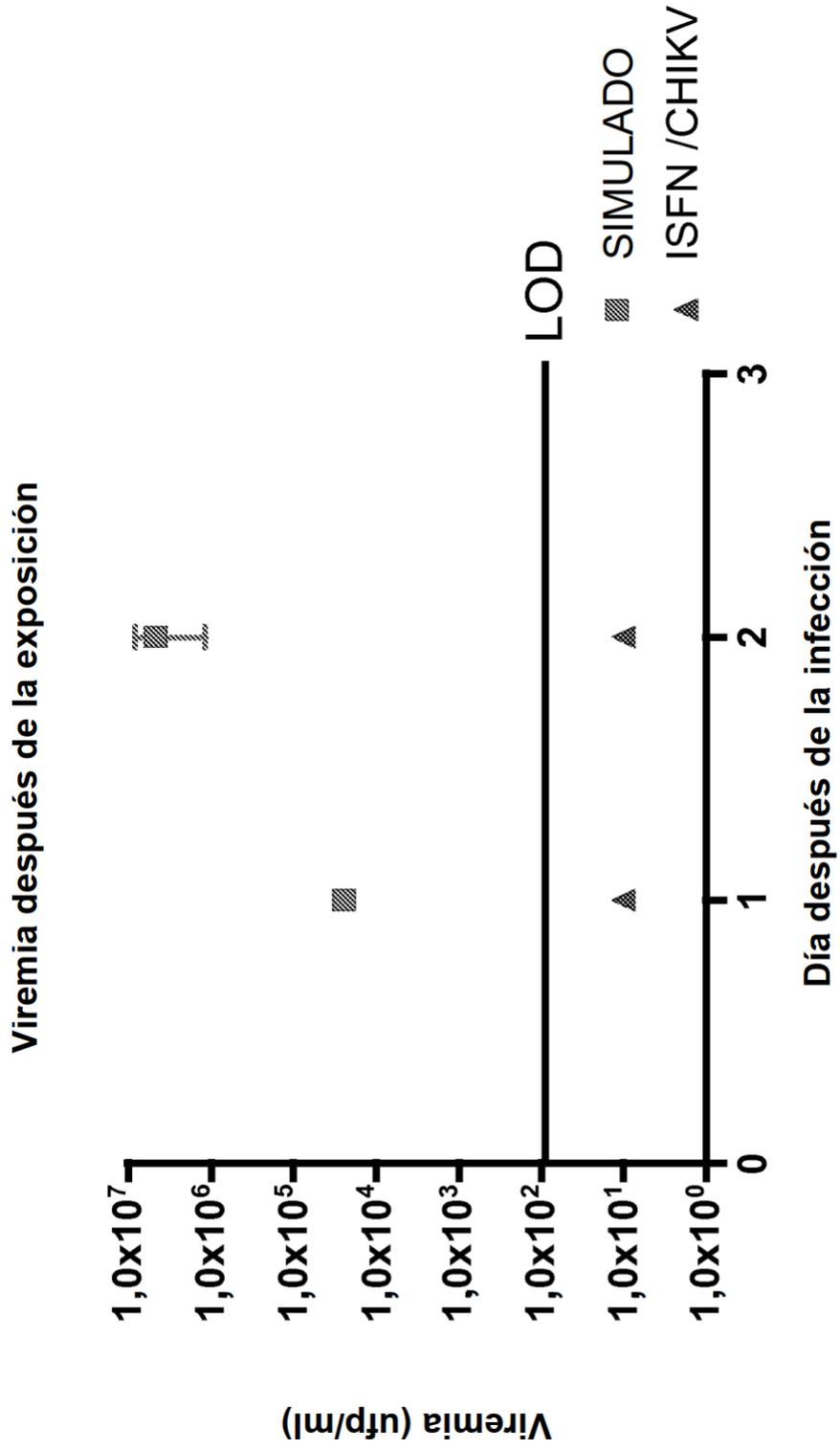


FIG. 21

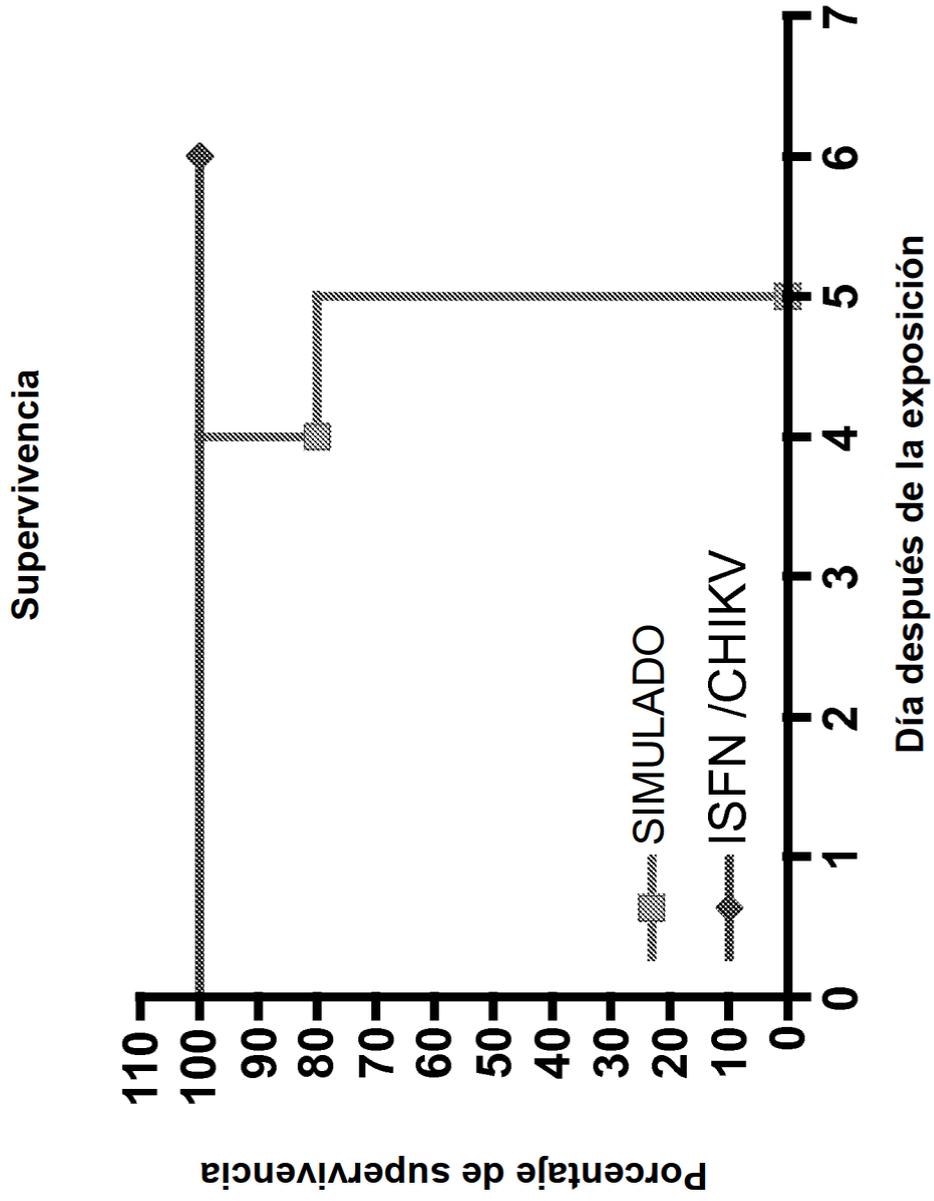


FIG. 22