

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613287-1 A2**

(22) Data de Depósito: 07/06/2006
(43) Data da Publicação: 28/12/2010
(RPI 2086)



(51) Int.Cl.:
C12N 7/08
A61K 39/12
C07K 14/18
C12N 15/40

(54) Título: **CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-2 VIVO ATENUADA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO, POLIPROTEÍNA ISOLADA CODIFICADAS PELA SEQ ID Nº.1 OU FRAGMENTOS DESTA E FRAGMENTO DA POLIPROTEÍNA**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 US 60/691,274

(73) Titular(es): Sanofi Pasteur

(72) Inventor(es): Bruno Guy, Claire Huang, Jean Lang, Richard Kinney, Véronique Barban

(74) Procurador(es): Paola Calabria Mattioli

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006001513 de 07/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/134443 de 21/12/2006

(57) Resumo: CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-2 VIVO ATENUADA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO, POLIPROTEÍNA ISOLADA CODIFICADAS PELA SEQ ID Nº1 OU FRAGMENTOS DESTA E FRAGMENTO DA POLIPROTEÍNA. A presente invenção se refere a cepas de VDV2 (vírus da dengue sorotipo-2 derivado de células VERO) vivo atenuada que foram obtidas a partir da cepa do vírus da dengue-2 tipo selvagem 16681 pela passagem em células PDK e células VERO. A presente invenção se refere também a uma composição de uma vacina que inclui uma cepa VDV2.



PI0613287-1

1

**“CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-2 VIVO ATENUADA, COMPOSIÇÃO
IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO,
POLIPROTEÍNA ISOLADA CODIFICADAS PELA SEQ ID Nº.1 OU
FRAGMENTOS DESTA E FRAGMENTO DA POLIPROTEÍNA”**

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a novas cepas de VDV2 (vírus da dengue sorotipo-2 derivado de células VERO) vivas atenuadas que são derivadas a partir da cepa do vírus da dengue tipo selvagem-2 16681 pela passagem sobre células PDK e sanitização em células Vero. A presente invenção se refere também a uma composição de uma vacina que compreende tal cepa VDV2.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A dengue é uma doença causada por quatro tipos sorológicos virais estreitamente relacionados, mas antigenicamente distintos, (Gubler, 1988; Kautner *et al.*, 1997; Rigau-Pérez *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 1997), do gênero *Flavivirus* (Gubler, 1988). A infecção por um sorotipo do vírus da dengue pode produzir um espectro de doenças clínicas que podem variar de uma síndrome viral não específica a uma severa doença hemorrágica fatal. O período de incubação da febre da dengue (DF), após as picadas de mosquitos dura em média 4 dias (variação de 3-14 dias). DF caracteriza-se por febre bifásica, dor de cabeça, dores em várias partes do corpo, prostração, exantema, linfadenopatia e leucopenia (Kautner *et al.*, 1997; Rigau-Pérez *et al.*, 1998). O período virulento é o mesmo que o da doença febril (Vaughn *et al.*, 1997). A recuperação da DF é geralmente concluída em 7 a 10 dias, mas a astenia prolongada é comum. A diminuição na contagem de leucócitos e plaquetas é freqüente.

A dengue hemorrágica (DFH) é uma doença febril grave caracterizada por anormalidades da homeostase e aumento da permeabilidade

vascular que pode levar a hipovolemia e hipotensão (Síndrome de Choque por dengue, DSS) muitas vezes complicada por grave hemorragia interna. A taxa de mortalidade do caso DFH pode ser tão alta quanto 10%, sem tratamento, mas inferior a 1% na maioria dos centros com experiência terapêutica (WHO Technical Guide, 1986).

O diagnóstico laboratorial de rotina das infecções por dengue é baseado no isolamento do vírus e/ou na detecção de anticorpos específicos para o vírus da dengue.

A dengue é a segunda doença infecciosa tropical mais importante após malária, com mais da metade da população mundial (2,5 bilhões) vivendo nas áreas de risco de epidemia. Há uma estimativa de que 50 a 100 milhões de casos de dengue, 500.000 pacientes hospitalizados com DFH e 25.000 mortes por dengue ocorrem todos os anos. A dengue é endêmica na Ásia, no Pacífico, África, América Latina e Caribe. Mais de 100 países tropicais têm endemias de infecções virais de dengue, e DFH têm sido documentados em mais de 60 destes países (Gubler, 2002; Monath, 1994). Um número de fatores bem descritos parecem estar envolvidos nas infecções por dengue: crescimento populacional, urbanização descontrolada e não planejada e particularmente associado com a pobreza, aumento de viagens aéreas, a falta de controle efetiva dos mosquitos, bem como a deterioração das infra-estruturas sanitárias e de saúde pública (Gubler, 2002). A conscientização da dengue pelos viajantes e estrangeiros está aumentando (Shirtcliffe *et al.*, 1998). A dengue provou ser uma das principais causas de doença febril nas tropas norte-americanas durante o posicionamento estratégico em áreas tropicais onde a dengue é endêmica (DeFraitas *et al.*, 1994).

Os vírus são mantidos em um ciclo que envolve os humanos e o *Aedes aegypti*, um mosquito doméstico, que pica durante o dia e que prefere se alimentar nos seres humanos. A infecção no humano é iniciada através da

injeção do vírus durante a alimentação de sangue por um mosquito *Aedes aegypti* infectado. O vírus na saliva é depositado principalmente nos tecidos extravasculares. O principal tipo celular infectado após inoculação são as células dendríticas, que posteriormente migram para drenagem dos gânglios linfáticos (linfonodos) (Wu e Al., 2000). Após a replicação inicial na pele e a drenagem para os gânglios linfáticos, o vírus aparece no sangue durante a fase aguda febril, geralmente por 3 a 5 dias.

Monócitos e macrófagos estão juntamente com as células dendríticas entre os alvos principais do vírus da dengue. A proteção contra a reinfecção homotípica é completa e provavelmente por toda a vida, mas a proteção cruzada entre os tipos de dengue dura menos de 12 semanas (Sabin, 1952). Conseqüentemente um paciente pode experimentar uma segunda infecção com um sorotipo diferente. Uma segunda infecção por dengue é teoricamente um fator de risco para desenvolver uma doença severa. No entanto, a DFH é multifatorial, incluindo: a cepa do vírus envolvido, bem como a idade, o estado imune, e predisposição genética do paciente. Dois fatores têm um papel importante na ocorrência da DFH: uma rápida replicação viral com alta viremia (a gravidade da doença está relacionada com o nível da viremia (Vaughn *et al.*, 2000) e uma importante resposta inflamatória com liberação de altos níveis de mediadores inflamatórios (Rothman e Ennis, 1999)).

Não existe um tratamento específico contra a dengue. O tratamento da DF se baseia no repouso na cama, controle da febre e dores com o uso de analgésicos e antipiréticos, e adequada ingestão de fluidos. O tratamento da DFH necessita da correção da perda de fluidos, substituição dos fatores de coagulação, e infusão de heparina.

As medidas preventivas contam atualmente com o controle do vetor e medidas de proteção pessoal, que são medidas caras e difíceis de

serem aplicadas. Nenhuma vacina contra a dengue está atualmente registrada. Desde os 4 sorotipos da dengue que estão em circulação no mundo e uma vez que existem relatos de que estes estão envolvidos nos casos de DFH, a vacinação deverá idealmente conferir proteção contra todos os 4 sorotipos do
5 vírus da dengue.

Vacinas vivas atenuadas (LAVs), que reproduzem a imunidade natural, têm sido utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra muitas doenças, incluindo alguns vírus pertencentes ao mesmo gênero da dengue (exemplos de vacinas de *Flavivirus* vivo atenuadas comercialmente disponíveis
10 incluem vacinas da febre amarela e da encefalite japonesa). As vantagens de vacinas de vírus vivos atenuadas estão na sua capacidade de replicação e indução tanto de respostas humorais quanto de respostas imune-celulares. Além disso, a resposta imune induzida por um conjunto de vírion da vacina contra os diferentes componentes do vírus (proteínas estruturais e não
15 estruturais) reproduz as respostas induzidas pelas infecções naturais.

O projeto da vacina da dengue foi iniciado na Tailândia, no Centro de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento Mahidol University. Vacinas candidatas com vírus vivo-atenuadas foram desenvolvidos com êxito, a uma escala laboratorial, para o
20 vírus da dengue sorotipo 1 (cepa 16007, passagem 13 = LAV1), sorotipo 2 (cepa 16681, passagem 53), e sorotipo 4 (cepa 1036, passagem 48) em células primárias de rim de cachorro (PDK), e para o sorotipo 3 (cepa 16562), em células primárias de rim de macaco verde (PGMK) (passagem 30) e células fetais de pulmão de macaco *Rhesus* (FRhL) (passagem 3). Essas vacinas
25 foram testadas como vacinas monovalente (sorotipo único), bivalente (dois sorotipos), trivalente (três sorotipos), e tetravalente (todos os quatro sorotipos) em voluntários tailandeses. Essas vacinas demonstraram ser seguras e imunogênicas em crianças e adultos (Gubler, 1997). Estas cepas de LAV 1-4

foram descritas na patente EP 1159968, em nome de Mahidol University e foram depositados perante a CNCM (CNCM I-2480; CNCM I-2481; CNCM I-2482 e CNCM I-2483, respectivamente).

A cepa Den-2 16681 foi recuperada a partir do soro de um
5 paciente com DFH (dengue Hemorrágica) em Bancoc em 1964 (Halstead *et al.*, 1970). O soro virêmico original havia sido passado 4 vezes sobre células BSC-1 (células renais de macaco verde africano) e 5 vezes em células LLC-MK₂ contínuas (células renais de macaco Rhesus). Em 1977, foi feita uma
10 passagem *in vivo* do vírus, em macacos susceptíveis (*Macaca Mulatta*), e, em seguida, novamente em células LLC-MK₂. Duas outras passagens em mosquitos (*Toxorhynchites amboinensis*) foram realizadas em 1980. A atenuação do vírus foi realizada por passagens a 32 °C em células PDK (células primárias de rim de cachorro). Atenuação das cepas foi verificada, de acordo com vários marcadores *in vitro* e *in vivo*. A passagem 50 preenchida
15 completamente todos estes critérios de atenuação e foi escolhida como semente mãe "*master seed*" para a produção da vacina (1982), na passagem 53. A vacina candidata DEN-2 PDK53 foi avaliada em seres humanos, encontrando-se fortemente imunogênica sem sinais e sintomas clínicos inconvenientes (Bhamarapravati *et al.*, 1989).

20 A seqüência completa da cepa do vírus da dengue-2 vivo atenuada (LAV2), que foi criada por R. Kinney *et al.* (CDC, Fort Collins) em 2001. Diferenças na seqüência entre as cepas de origem DEN-2 cepa 1681 (SEQ ID N°.3) e cepa LAV2 (SEQ ID N°.38) estão descritas na Tabela 1. Assim, a comparação genética do vírus tipo- selvagem cepa 16681 e da cepa
25 LAV-2 demonstrou um conjunto de 9 mutações pontuais que podem estar ligadas à atenuação da LAV2.

TABELA 1:

DIFERENÇAS NA SEQÜÊNCIA DEN-2 16681 E DEN-2 16681/PDK53 (LAV2)

Coordenadas		LAV2		16681	
Gene-aa	Posição	Nt	Aa	Nt	aa
Não codificado	Nt-57	T	-	C	-
PrM-29	Nt-524	T	Val	A	Asp
E-373	Nt-2055	T	Phe	C	Phe
NS1-53	Nt-2579	A	Asp	G	Gly
NS2A-181	Nt-4018	T	Phe	C	Leu
NS3-250	Nt-5270	A/T	Val/Glu	A	Glu
NS3-342	Nt-5547	C	Arg	T	Arg
NS4A-75	Nt-6599	C	Ala	G	Gly
NS5-334	Nt-8571	T	Val	C	Val

Alterações de nucleotídeos que modificam o códon correspondente são indicadas em negrito.

A cepa LAV2, que foi inicialmente estabelecida em 1983 foi rapidamente identificada como vacina candidata em potencial (Bhamarapravati e Yoksan, 1997).

Entretanto, nesse momento, a transmissão ao homem da Encefalite espongiforme através de culturas de mamíferos não foi encarado como um risco e rotineiramente o vírus foi mantido em células primárias de rim de cachorro (PDK). Além disso, esta cepa LAV2 corresponde a uma população heterogênea. Esta heterogeneidade representa um risco adicional devido a uma potencial seleção *in vitro* ou *in vivo* de uma das cepas presentes na composição.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Em face às estas preocupações crescentes, o requerente buscou desenvolver um processo de sanitização, a fim de se livrar de tais riscos. Pela transfecção de células Vero com RNA genômico purificadas de LAV2, seguida por três ciclos de amplificação em células Vero, e duas etapas sucessivas de purificação da placa de vírus, o requerente elaborou um novo vírus sorotipo 2 derivado de Vero (VDV2).

Esta nova cepa VDV2, a qual tem sido, portanto, derivadas pela

transferência para células VERO e biológicas clonadas difere da cepa LAV2 pela seqüência, homogeneidade de tamanho na placa e sensibilidade a temperatura, mas, sobretudo conserva algumas características fenotípicas e genotípicas do LAV2, como por exemplo: atenuação de manchas, fenótipo de
 5 pequenas placas, restrição de crescimento a alta temperatura, e foram conservadas as características imunogênicas das cepas LAV2. Estas características tornam esta nova cepa uma valiosa vacina candidata à imunização profilática em seres humanos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10

DEFINIÇÕES

"Vírus da dengue" são vírus de senso positivo, de RNA de fita simples pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviridae*. No caso da dengue sorotipo 2 (DEN-2) cepa 16681, a seqüência completa tem o comprimento de 10723 nucleotídeos (SEQ ID Nº.3). O genoma RNA contém
 15 um Cap tipo I no final 5'-, mas necessita de uma cauda poli(A) na extremidade 3'-. A organização dos genes é 5'- região não codificadora (NCR), proteínas estruturais (capsídio (C), pré-membrana / membrana (prM/M), envelope (E)) e proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) e 3' NCR. O genoma RNA viral está associado à proteína C para formar o nucleocápside
 20 (de simetria icosaedral). Tal como acontece com outros *Flavivirus*, o genoma DEN viral codifica uma fase de leitura aberta (ORF) ininterrupta, que é traduzido para uma única poliproteína.

Passagens seriais de cepas virulentas (causadoras de doença) da dengue-2 resultam no isolamento do vírus modificado que são "vivos
 25 atenuados", ou seja, infecciosos, ainda não capazes de causar doença. Estes vírus modificados são geralmente testados em macacos para avaliar a sua atenuação. No entanto, seres humanos são os únicos primatas que apresentam sinais clínicos da doença. Os vírus que causam de moderado (ou

seja, aceitável em termos de fins regulatórios, como apresentam uma relação risco/benefício positiva), a pouco ou nenhum efeito secundário (isto é, manifestações sistêmicas e/ou anormalidades biológicas e/ou reações locais) na maioria dos seres humanos testados, mas que continuam a infectar e
5 induzir uma resposta imunológica são chamados de "vivo atenuado".

O termo "LAV" denota cepas virais vivas atenuadas da dengue. No contexto da presente invenção "LAVs" são cepas de vírus vivos atenuadas inicialmente derivadas da cepa do vírus da dengue sorotipo 2 (DEN-2) 16681 por passagens em células primárias de rim de cachorro (PDK). Por exemplo,
10 "LAV2/PDK50" é a cepa atenuada estabelecida após 53 passagens da cepa 16681 em células PDK (DEN-2 16681/PDK53). "LAV2/PDK50" é a cepa atenuada estabelecida após 50 passagens da cepa 16681 em células PDK (DEN-2 16681/PDK50). A sequência de nucleotídeo LAV2/PDK53 é exibida na SEQ ID No. 38.

15 "VDV2" quer dizer uma LAV obtida pelo processo de sanitização divulgado no presente pedido. Uma VDV2 é, assim, um clone biológico (homogêneo) do vírus da dengue sorotipo 2 adaptado em células VERO capaz de induzir uma resposta imune humoral incluindo neutralização de anticorpos em primatas especialmente no ser humano. As cepas VDV2 da presente
20 invenção podem ser facilmente reconstruídas iniciando diretamente a partir das seqüências de VDV2 aqui divulgadas. A indução de uma resposta imune humoral pode ser facilmente determinada por um teste de ELISA. A presença de anticorpos neutralizantes no soro de uma vacina é avaliada pelos testes de neutralização por redução de placa, conforme descrito na seção 4.1.1.2.2. Um
25 soro é considerado como positivo para a presença de anticorpos neutralizantes quando o grau de anticorpo neutralizante assim determinado é, pelo menos, superior ou igual a 1:10.

Os termos "mutação" significam quaisquer mudanças detectáveis

de material genético, por exemplo, DNA, RNA, cDNA, ou a qualquer processo, mecanismo, ou resultado de tal mudança. Mutações incluem substituições de um ou mais nucleotídeos. No contexto do atual pedido, mutações identificadas na sequência genômica ou poliprotéica do vírus da dengue-2 são designados
5 ao abrigo da nomenclatura de Dunnen e Antonarakis (2000). Conforme definido por Dunnen e Antonarakis com relação a ácidos nucleicos, substituições são designadas por ">", por exemplo, "31 A>G" denota que uma A é alterada para uma G no nucleotídeo 31 da sequência de referência.

As variações no nível da proteína descrevem a consequência da
10 mutação e são apresentados como se segue. Códon de parada são designados por X (ex: R97X denota uma mudança de Arg96 a um códon de terminação). Substituições de aminoácido são designados por "S9G", o que significa que uma Ser na posição 9 é substituída pela Gly.

VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 2 DERIVADAS DE CÉLULAS VERO (VDV2)

15 A composição da vacina candidata LAV2 da dengue-2 anteriormente desenvolvida foi aperfeiçoada por um processo de sanitização.

A vacina da dengue sorotipo 2 derivada de vero (VDV2) divulgada no presente pedido utiliza o vírus DEN-2 16681 atenuado por passagens em série por células PDK. O VDV2 contém toda a sequência genômica dos vírus
20 vivos atenuados DEN-2, e produzem os mesmos sítios que estão ligados a atenuação como a cepa original LAV2, que foram testadas em seres humanos.

A sanitização da vacina candidata LAV2 foi feita através da remoção de proteínas e introduzindo apenas o material genômico viral purificado nas células Vero. Mais especificamente, a sanitização da cepa foi
25 realizada pela purificação e transfecção do RNA viral nas células Vero. O processo compreende das seguintes etapas:

(a) extração e purificação de RNA viral da cepa LVA2 purificadas da placa; (por exemplo, vírus DEN-2 16681/PDK50)

(b) associação vantajosa do RNA purificado com lipídios catiônicos;

(c) transfecção de células Vero, em particular células Vero LS10;

(d) recuperação dos vírus neo-sintetizados; e

5 (e) purificação de uma cepa VDV por purificação de placas e, opcionalmente, amplificação em células hospedeiras, especialmente em células Vero.

A tecnologia das células Vero é uma tecnologia bem conhecida, que tem sido utilizada para diferentes produtos comerciais (vacinas injetáveis e
10 orais contra a poliomielite e contra raiva). Na presente invenção células Vero qualificadas foram vantajosamente utilizadas para garantir a ausência de quaisquer riscos potenciais ligados à presença de agentes adventícios. Por "células VERO qualificadas" se entende células ou linhagens celulares para o qual as condições da cultura são conhecidas, e é tal, que as referidas células
15 são isentas de quaisquer agentes adventícios. Estes incluem, por exemplo: células VERO LS10 da Sanofi Pasteur.

As cepas VDV assim isoladas são classicamente armazenadas quer sob a forma de uma composição congelada ou sob a forma de um produto liofilizado. Para esse efeito, a VDV pode ser misturada com um diluente
20 clássico, uma solução aquosa tamponada composta que compreende de compostos crioprotetores tal como, açúcar, álcool e estabilizadores. O pH antes do congelamento ou liofilização é vantajosamente estabelecido entre 6 a 9, por exemplo, em torno de 7, como um pH de 7,5 +/- 0,2 conforme determinado por um pHmetro em RT. Antes da utilização, o produto liofilizado é misturado a um
25 solvente farmacêutico ou excipiente como um NaCl a 4% estéril para reconstituir um composto líquido imunogênico ou vacina.

A variante Glu da LAV2 vacinal, na posição NS3-250, foi selecionada durante a transfecção e clonagem, e posições 5'NC-57 e NS1-53,

também identificadas como críticas para a atenuação da LAV2 vacinal, ambos permaneceram conservados na sequência da VDV2.

No seqüenciamento, a atenuação Loci específicas, dos vírus recuperados após a transfecção, não revelou qualquer mutação, em
5 comparação com a SEQ ID Nº.38. Os vírus VDV2 biologicamente clonados exibem um fenótipo de placa homogênea e uma notável estabilidade genética no que diz respeito à sua cepa de origem LAV2 como esta pode ser deduzida principalmente a partir da conservação da atenuação genotípica.

A cepa VDV2 (passagem 11) foi seqüenciada e, comparada com
10 a cepa do vírus vivo atenuada da dengue sorotipo 2 (LAV2) seqüência (SEQ ID nº 38). Uma diferença no conjunto de 10 nucleotídeos foi identificada, desencadeando seis substituições de aminoácidos localizada nos peptídeos estruturais M e Env, e também nos peptídeos não estruturais NS3 e NS5. Nenhum destas diferenças corresponde a posições de atenuação da LAV2.

15

TABELA 2:**COMPARAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS ENTRE AS CEPAS LAV2/PDK53 E VDV2 PASSAGEM****11.**

Nucleotídeos			Aminoácidos			
Posição	LAV2	VDV2	Região	Posição	LAV2	VDV2
736	G	C	M	9	G	R
1619	G	A	B	228	G	E
1638	A	G	E	234	K	K
2520	G	A	NS1	33	K	K
4723	T	A	NS3	69	S	T
5062	G	C	NS3	181	D	H
9191	G	A	NS5	541	R	K
9222	A	G	NS5	551	E	E
10063	T	A	NS5	832	S	T
10507	A	G	3'nc	-	-	-

Em cinza: diferenças nas proteínas estruturais; negrito: diferenças de proteínas não estruturais.

A presente invenção fornece assim cepas do vírus da dengue-2 vivos atenuadas que foram obtidas a partir de vírus DEN-2 16681 tipo selvagem atenuados por passagens seriais em células PDK e, em seguida, pela passagem e sanitização em células VERO. Em particular, as cepas atenuadas da presente invenção que compreendem, pelo menos, as mutações identificadas de seqüência (não-silenciosa e opcionalmente silenciosa) em relação à seqüência nucleotídica ou seqüência poliprotéica das cepas DEN-2 16681 tipo selvagem e LAV2/PDK53.

Conseqüentemente, a presente invenção está relacionada a uma cepa do vírus da dengue-2 vivo atenuada isolado, que compreende, ou é constituída por, uma seqüência da cepa LAV2/PDK53 (SEQ ID Nº. 38) em que pelo menos os nucleotídeos nas posições 736, 1619, 4723, 5062, 9191, 10063 e 10507, e, opcionalmente, 1638, 2520, 9222 e 10361, estão mutados, com a condição de que os seguintes nucleotídeos não estão mutados: 57, 524, 2055, 2579, 4018, 5547, 6599, e 8571. De preferência, as mutações são substituições. De preferência, o nucleotídeo na posição 736 é C, o nucleotídeo na posição 1619 é A, o nucleotídeo na posição 4723 é A, o nucleotídeo na posição 5062 é A, o nucleotídeo na posição 9191 é A, o nucleotídeo na posição 10063 é A e o nucleotídeo na posição 10507 é G.

O nucleotídeo na posição 5270 pode ser A ou T, preferencialmente é A.

Ainda preferencialmente, a cepa isolada, de acordo com a presente invenção contém seqüência SEQ ID Nº.38 que compreende pelo menos das mutações 736 G>C, 1619 G>A, 4723 T>A, 5062 G>C, 9191 G>A, 10063 T>A, e 10507 A>G, e opcionalmente as mutações 1638 A>G, 2520 G>A, e/ou 9222 A>G.

Portanto, um vírus da dengue-2 vivo atenuado, de acordo com a presente compreende a seqüência da cepa da dengue-2 16681 tipo selvagem (SEQ ID Nº.3) em que a dita seqüência contém, pelo menos, as mutações 57

C>T, 524 A>T, 736 G>C, 1619 G>A, 2055 OT, 2579 G>A, 4018 C>T, 4723 T>A, 5062 G>C, 5547 T>C, 6599 G>C, 8571 OT, 9191 G>A, 10063 T>A, e 10507 A>G. De preferência, uma cepa viva atenuada, de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente da mutação 1638 A>G, 2520
5 G>A, e/ou 9222 A>G em referência à seqüência de nucleotídeos da cepa 16681 tipo selvagem (SEQ ID N°3).

As cepas do vírus da dengue-2 vivos atenuadas, de acordo com a presente invenção abrange cepas variantes que compreende de uma seqüência SEQ ID N°38 mutada nas posições 736, 1619, 4723, 5062, 9191,
10 10063, e 10507, conforme acima definido, e que ainda incluem a substituição de um ou mais nucleotídeos em determinada posição dos códons que resulta em qualquer alteração no aminoácido codificado nesta posição.

Vantajosamente, as cepas do vírus da dengue-2 vivos atenuadas, de acordo com a presente invenção compreendem uma seqüência que se
15 diferencia por um número limitado de mutações, por exemplo: Não mais que 5, ainda preferencialmente não superior a 2, a partir SEQ ID N°1.

De preferência, a seqüência genômica do vírus da dengue-2, de acordo com a presente invenção consiste da seqüência de nucleotídeo SEQ ID N° 1.

20 A presente invenção refere-se também as cepas de vírus da dengue-2 vivo atenuada que podem ser obtidas a partir da cepa VDV2 da seqüência SEQ ID N°1 por outras passagens em células, em particular em células Vero.

A presente invenção também diz respeito a um ácido nucléico
25 isolado que compreende, ou é constituído pela seqüência de DNA SEQ ID N°1 ou sua seqüência de RNA equivalente.

Uma "molécula de ácido nucléico" refere-se ao fosfato éster polimérico formado por ribonucleosídeos (adenosina, guanosina, uridina ou

citidina; "moléculas RNA") ou deoxirribonucleosídeos (deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina, ou deoxicitidina; "moléculas DNA"), ou qualquer fosfoéster análogo, tais como fosforotioatos e tioésteres, em ambos a forma de fita simples, ou uma fita dupla-hélice.

5 Como utilizado no presente pedido, por seqüência RNA "equivalente" a SEQ ID N°1 se entende uma seqüência SEQ ID N°1 em que as deoxitimidinas foram substituídas por uridinas. Como a SEQ ID N°1 constitui a seqüência cDNA VDV2, a seqüência RNA equivalente corresponde assim à fita RNA positiva do VDV2.

10 A presente invenção refere-se também a poliproteínas da seqüência SEQ ID N°2 e aos fragmentos desta. A SEQ ID N°2 é a seqüência da poliproteína codificada pela SEQ ID N°1.

 Um "fragmento" de uma proteína de referência significa uma seqüência polipeptídica que compreende uma cadeia de aminoácidos consecutivos na proteína de referência. Um fragmento pode ter o comprimento
15 de, pelo menos, 8, pelo menos 12, pelo menos 20, aminoácidos.

 Os ditos fragmentos de poliproteínas da seqüência SEQ ID N°2 compreendem, pelo menos, uma arginina na posição 9 da proteína M (posição 214 da SEQ ID nº 2) e/ou um ácido glutâmico 228 da proteína E (posição 508 da SEQ ID N° 2), e/ou uma treonina na posição 69 da proteína NS3 (posição 1543 da SEQ ID N° 2), e/ou uma histidina na posição 181 da proteína NS3 (posição 1656 da SEQ ID N° 2), e/ou uma lisina na posição 541 da proteína NS5 (posição 1725 da SEQ ID N° 2), e/ou uma treonina na posição 832 da proteína NS5 (posição 3032 da SEQ ID N°2).

25 De acordo com uma realização o fragmento da poliproteína codificada pela SEQ ID N°1 é ou compreende a proteína M, e/ou proteína E e/ou proteína NS3 e/ou proteína NS5.

COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS E VACINAS

A presente invenção também diz respeito a uma composição imunogênica, adequada para ser utilizada como uma vacina, que compreende uma cepa VDV2, conforme descrita na presente invenção.

5 As composições imunogênicas, de acordo com a presente invenção produzem uma resposta imune-humoral em direção ao vírus da dengue compreendendo na neutralização de anticorpos.

Preferivelmente, a composição imunogênica é uma vacina.

De acordo com um exemplo de realização, a composição imunogênica é uma composição monovalente, ou seja, produz uma resposta
10 imunológica e/ou confere proteção apenas contra o vírus da dengue-2.

De acordo com outro exemplo de realização, a presente invenção relaciona-se com uma composição imunogênica multivalente para dengue. Tal composição imunogênica ou vacina multivalente podem ser obtidas pela combinação de vacinas para dengue monovalentes individuais. A vacina ou
15 composição imunogênica pode ainda incluir, pelo menos, um vírus da dengue vivo atenuado de outro sorotipo. Em particular, a vacina imunogênica ou composição pode incluir um VDV2 de acordo com a presente invenção em combinação com, pelo menos, um vírus da dengue vivo atenuado selecionado do grupo constituído pelo sorotipo 1, sorotipo 3, e sorotipo 4.

20 Preferivelmente, a composição imunogênica ou vacina pode ser uma composição de vacina tetravalente da dengue, ou seja, a composição de uma vacina que inclui um VDV2 de acordo com a presente invenção em combinação com uma cepa de vírus da dengue-2 vivo atenuada, uma cepa de vírus da dengue-3 vivo atenuada e uma cepa de vírus da dengue-4 vivo atenuada.

25 Cepas de vírus vivos atenuadas da dengue-1, dengue-3, dengue-4 foram descritas anteriormente. Pode ser feita referência às vacinas vivas atenuadas, que foram desenvolvidos na Mahidol University pela passagem dos vírus da dengue sorotipo 1 (cepa 16007, passagem 13; LAV1), e sorotipo 4 (cepa

1036, passagem 48, LAV4) em células primárias de rim de cachorro (PDK), e para o sorotipo 3 (cepa 16562), em células primárias de rim de macaco verde (PGMK) (passagem 30) e células de pulmão fetal de Rhesus (FRhL) (passagem 3) (LAV3). As seqüências de nucleotídeo da LAV1 (SEQ ID N°.40), LAV3 (SEQ ID N°.41), e
5 LAV4 (SEQ ID N°.42) estão demonstradas na lista de seqüência anexa.

Vantajosamente, uma cepa de vírus vivo atenuada da dengue-1 pode corresponder a uma cepa VDV1, que foi obtida a partir da cepa LAV1 desenvolvida pela Mahidol por um processo de sanitização de acordo com a invenção. Em especial, uma cepa de vírus da dengue-1 vivo atenuada (VDV1)
10 pode compreender, e vantajosamente consistir da seqüência SEQ ID N°.39.

Composições imunogênicas incluindo vacinas podem ser preparadas como injetáveis que podem corresponder a soluções líquidas, emulsões ou suspensões. Os ingredientes imunogênicos ativos podem ser misturados com excipientes farmacêuticamente aceitáveis que são compatíveis com estes.

15 As composições imunogênicas ou vacinas, de acordo com a presente invenção podem ser preparadas utilizando qualquer método convencional conhecido pelos técnicos no assunto. Convencionalmente os antígenos, de acordo com a presente invenção são misturados com um solvente ou excipiente farmacêuticamente aceitável, como a água ou solução salina tamponada com
20 fosfato, agentes umidificantes, material de enchimento, emulsificantes estabilizadores. O excipiente ou diluente serão selecionados em função da forma farmacêutica escolhida, do método e da via de administração e também da prática farmacêutica. Excipientes ou diluentes adequados e também as exigências em termos de formulações farmacêuticas, estão descritas em Remington's
25 Pharmaceutical Sciences, que representa um livro de referência neste domínio.

Preferencialmente, a composição imunogênica ou vacina corresponde a uma composição injetável que inclui uma solução aquosa tamponada para manter, por exemplo, o pH (conforme determinado pelo RT

com um pHmetro) entre 6 a 9.

A composição, de acordo com a presente invenção pode adicionalmente conter de um adjuvante, ou seja, uma substância que melhora, ou aumenta, a resposta imune produzida pela cepa VDV2. Qualquer adjuvante ou
5 mistura de adjuvantes farmacêuticamente aceitável convencionalmente utilizado no campo das vacinas humanas podem ser utilizadas para esta finalidade.

As composições imunogênicas ou vacinas, de acordo com a presente invenção podem ser administradas por qualquer via convencional normalmente utilizada no campo das vacinas humanas, tais como a via parenteral (por exemplo,
10 via intradérmica, subcutânea, intramuscular) no contexto da presente invenção as composições imunogênicas ou vacinas são composições de preferência injetáveis administradas por via subcutânea na região deltóide.

MÉTODO DE IMUNIZAÇÃO

A presente invenção fornece ainda um método de imunizar um
15 hospedeiro em tal necessidade contra a infecção pelo vírus dengue que compreende a administração ao hospedeiro de uma quantidade imunoefetiva de uma composição imunogênica ou vacina, de acordo com a presente invenção.

Um "hospedeiro com tal necessidade" denota uma pessoa em situação de risco de infecção por dengue, ou seja, pessoas que viajam para
20 regiões em que a infecção pelo vírus da dengue está presente, e também dos habitantes destas regiões.

A via de administração é qualquer via convencional utilizada no campo da vacinação. A escolha da via administração depende da formulação que é selecionada. De preferência, a composição imunogênica ou vacina
25 corresponde a uma composição injetável administrada por via subcutânea, vantajosamente na região deltóide.

A quantidade de LAV ou VDV em particular VDV2 nas composições imunogênicas ou vacinas podem ser convenientemente

expressas em unidade virais formadoras de placas (PFU) ou unidade de doses infectantes para 50% em cultura de células (CCID₅₀) e preparadas utilizando técnicas farmacêuticas convencionais. Por exemplo, a composição, de acordo com a presente invenção pode ser preparada na forma de dosagem contendo

5 10 a 10⁶ CCID₅₀, ou de 10³ a 10⁵ CCID₅₀ de LAV ou VDV, por exemplo, 4 ± 0,5 log₁₀ CCID₅₀ de cepa VDV2 de uma composição monovalente. Quando a composição é multivalente, para reduzir a possibilidade de interferência viral e, assim, de conseguir um equilíbrio na resposta imune (ou seja, uma resposta imunológica contra todos os sorotipos contidos na composição), as

10 quantidades de cada uma dos diferentes sorotipos de dengue presente nas vacinas administradas podem não ser iguais.

Uma "quantidade imunoefetiva" é uma quantidade que é capaz de induzir uma resposta imune humoral compreendendo anticorpos neutralizantes no soro de uma vacina, como avaliado pelo teste de neutralização com redução em

15 placa, conforme descrito na seção 4.1.1.2.2; um soro é considerado como positivos para a presença de anticorpos neutralizante quando o título do anticorpo neutralizante assim determinado é pelo menos, superior ou igual a 1:10.

O volume de administração pode variar, dependendo da via de administração. Injeções subcutâneas podem variar em termos de volume de

20 cerca de 0,1 ml a 1,0 ml, de preferência 0,5 ml.

O tempo ótimo para a administração da composição é cerca de um a três meses antes da primeira exposição ao vírus da dengue. As vacinas da presente invenção podem ser administradas como agentes profiláticos em adultos ou crianças com risco de infecção por dengue. A população

25 direcionada abrange pessoas que são nativas bem como as não-nativas com relação ao vírus da dengue. As vacinas da presente invenção podem ser administradas em dose única ou, opcionalmente, a administração pode envolver o uso de uma dose primária seguida de uma dose de reforço que é

administrada, por exemplo, de 2-6 meses mais tarde, conforme determinado como apropriado pelos técnicos no assunto.

A presente invenção poderá ser adicionalmente descrita tendo em vista as seguintes figuras e exemplos.

5

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um resumo da história da semente pré-mãe ("*pré master seed*") VDV2.

10 A Figura 2 é um fluxograma que resume o processo de produção desenvolvido que dá origem ao Produto Completo (monovalente), dose "pronta para o uso".

A Figura 3 é uma representação diagramática do mapa genômico do VDV2. A seta acima representa a codificação da seqüência poliprotéica. As setas abaixo representam a seqüência codificadora de peptídeos maduros. As barras verticais simbolizam as variações nucleotídicas entre as cepas da
15 dengue-2 tipo selvagem 16681 e a cepa LAV2. Os asteriscos designam as variações nucleotídicas entre LAV2 e VDV2.

A Figura 4 mostra a análise do tamanho da placa após 7 dias de incubação a 37 °C para o vírus da dengue-1 LAV2, VDV2, e cepa 16681.

20 A Figura 5 é uma análise gráfica que mostra o tamanho da distribuição na placa para o vírus da dengue-2 LAV2, VDV2, e cepa 16681.

A Figura 6 é um resumo do desenho do estudo para a avaliação da segurança do VDV2 monovalente, em adultos saudáveis sem precedentes de tratamento para *Flavivirus* (*Flavivirus*-naive).

EXEMPLOS

25

EXEMPLO 1

SANITIZAÇÃO

1.1 PURIFICAÇÃO DE RNA VIRA

O processo de purificação e transfecção de RNA foi realizado da

seguinte forma. Uma suspensão de DEN-2/PDK50 foi ressuspensa em 0,5 ml de água e diluída, a fim de conter, pelo menos, 3×10^4 e até 3×10^7 TCID₅₀ ou PFU de vírus por mililitro. Uma unidade de benzonase diluída em 0,01 ml de meio de William foi adicionada em 0,5 ml de vírus, a fim de digerir moléculas de DNA ou RNA de origem celular, e a solução foi incubada durante 2 horas a 4 °C em um agitador. No final da etapa de incubação, 0,65 ml de tampão desnaturante contendo cloreto de guanidina, detergente (SDS), e β mercaptoetanol (tampão RTL- β mercaptoetanol, fornecidos no kit RNeasy Mini Kit, Qiagen Ref. 74104), foram adicionados e proteínas foram extraídas uma vez com fenol/clorofórmio (1/1) vol/vol e uma vez com clorofórmio vol/vol, seguido por centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm, à temperatura ambiente. Após cada extração, a fase aquosa foi coletada, tendo o cuidado de não coletar materiais (precipitado branco), na interface, e transferidos para um tubo de Eppendorf de 1 ml limpo. A solução de RNA foi então aplicada em uma coluna QIAgen seguindo as recomendações do fabricante (RNeasy minikit, QIAgen), a fim de eliminar vestígios de solvente, e eluído em 0,06 ml de água livre de nuclease. A presença de RNA viral foi confirmada por RT-PCR quantitativo, utilizando uma curva padrão estabelecido com quantidades conhecidas do vírus em TCID₅₀/ml.

1.2 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS VERO COM RNA PURIFICADO

A transfecção foi realizada utilizando lipofectamina (Reagente LF2000, Life Technologies), uma mistura de lipídios catiônicos que associamos ao RNA através de interações de carga e permitindo a transferência de complexos no citoplasma das células pela fusão com a membrana celular. A quantidade ótima de reagente LF2000 foi determinada em uma experiência preliminar pela incubação de células Vero, plaqueadas 16 a 24 horas antes ($0,3 - 0,5 \times 10^6$ células por poço em um placa de 6 poços), com doses crescentes (5 a 20 µL) de lipofectamina. As células foram então incubadas por 4 a 5 horas a 32 °C, 5% CO₂, antes de substituir o meio por meio de cultura fresco, sem FCS, e a incubação continuou overnight a 32 °C. A toxicidade (células

redondas, refração ou células flutuantes, homogeneidade das células em monocamada) foi verificada regularmente durante 48 horas, sob um microscópio invertido. A dose mais elevada de lipofectamina que não foi tóxica nestas condições foi de 10 µL e foi escolhida para a transfecção de RNA.

5 Quatro transfecções foram realizadas em paralelo, utilizando 1/4 da preparação do RNA purificado (cerca de 2×10^4 Log eqTCID₅₀, de acordo com qTR-PCR). Vinte e cinco microlitros da solução de RNA foram diluídas em 500 µL de meio OptiMEM (GIBCO) contendo 15 µL de reagente LF2000 (uma mistura de lipídios catiônicos que associado ao RNA através interações de

10 cargas e permitem a transferência de complexos no citoplasma das células por fusão com a membrana celular). 200 ng de levedura tRNA foram adicionados como transportadora em 2 das 4 reações.

 Foi permitido que as 4 misturas de transfecções se precipitassem durante 10 minutos à temperatura ambiente antes da adição à 6 poços em

15 placas confluentes de células Vero, e incubação a 36 °C. Após 4 horas a mistura de transfecções foi removida e as células foram lavadas uma vez em PBS. Três mililitros de meio pós-transfecção (Williams, GIBCO) foram adicionados, e a incubação foi mantida durante 5 dias a 32 °C. O meio de cultura foi então substituído por 3 ml de meio de infecção para dengue

20 (Williams complementada com 10 mM MgSO₄).

 Um foco de células apresentando efeitos citopáticos típicos (arredondamento e refração celular), foi detectada no dia 8 após a transfecção em 1 de 2 poços transfectados na presença de tRNA. A liberação do vírus no sobrenadante dessas células foi confirmada por qRT - PCR. Onze

25 dias após a transfecção, os efeitos citopáticos típicos foram detectados apenas neste poço, enquanto o sobrenadante dos outros três poços transfectados permaneceram negativos.

 A solução viral recuperada após a transfecção foi nomeada de

TV100 (em vez de 16681 PDK50/Vero-2), e exibiu título de infecção de 5,8 logTCID₅₀/ml após a diluição a 1/2, em solução aquosa tamponada contendo agentes crioprotetores (pH = 7,5).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS RECUPERADOS APÓS A TRANSFEÇÃO

5 Seqüenciamento de spot de Loci específicos importante para atenuação foi realizada por R. Kinney (CDC, Fort Collins). Os dados são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3:

SEQÜENCIAMENTO DAS POSIÇÕES ESPECÍFICAS DE ATENUAÇÃO DOS VÍRUS

10

TRANSFECTADOS

Vírus	5'-NC-57	NS1-53	NS3-250
	Nt 57	Nt 2579 (aa)	Nt 5270 (aa)
DEN-2 16681	C	G (Gly)	A (Glu)
DEN-2 PDK53	T	A (Asp)	T/A (Val/Glu)
TV100	T	A (Asp)	A (Glu)

15

O VDV2 manteve as loci atenuantes importantes em 5'NC-57 e NS1-53, e locus da 16681 tipo-selvagem NS3-250-Glu variante na vacina PDK53. A mistura NS3-250-Glu/Val na vacina PDK53 mostrou-se estável entre passagens PDK45 e PDK53, sugerindo que a seleção tenha ocorrido nas células Vero. A análise prévia da vacina DEN-2 isolada do soro de um vacinado demonstrou que esta seleção pode ocorrer também em humanos.

20

O tamanho das placas foi mensurado nas células Vero. Resumidamente, células Vero foram plaqueadas na cultura a uma densidade de 1.000.000 células/cm², contendo 4% de FBS. Após a incubação overnight, o meio foi removido e as células foram infectadas com diluições seriais duplicadas e quintuplicadas do vírus. Após 1,5 horas a 37 °C, 5% CO₂, o inóculo foi removido e as células foram incubadas a 37 °C 5% CO₂ em meio mínimo de Eagle (MEM), contendo 1,26% de metilcelulose e 10% de FBS.

Após 11 dias de incubação, as placas foram fixadas por 20 minutos em acetona a -20 °C e revelada por imuno-coloração com um mAb específico para *Flavivirus*, diluído em 2,5 µg/ml. Placas virais foram mensuradas utilizando um software de análise de imagem (Saisam / Microvision).

- 5 O VDV2 foi comparado com sementes LAV2 16681/PDK50 (Tabela 4) e exibiu placas pequenas semelhante de 1-3 mm de diâmetro.

TABELA 4: TAMANHO DAS PLACAS DO LAV2 16681/PDK50 E VDV2

Etapa	Vírus	LP/MP	SP
Antes da transfecção	LAV2 PDK50	0	319
Após a transfecção	VDV2 não clonado	0	183

LP/MP: Número de placas grandes/médias em 6 poços

SP: número de placas pequenas em 6 poços

10

1.4 PURIFICAÇÃO DE PLACAS

Três passagens adicionais de amplificação (P2 a P4) foram realizadas sobre os vírus recuperados após a transfecção. A clonagem biológica por purificação de placas foi realizada na passagem P3 e P4 do vírus (chamado LST 003 e LST 007, respectivamente).

15

- Resumidamente, células Vero foram plaqueadas em placas de 6 poços e infectadas com o vírus em diluições seriadas, a fim de obter entre 1 e 20 placas por placas (de cultura). Após 1,5 horas a 37 °C 5% CO₂, o inóculo foi removido e as células foram incubadas em 3 ml de meio sólido composto de MEM - 10% FCS pré-aquecido a 42 °C e misturado extemporaneamente com 2% de agarose derretida equilibrada a 42 °C. Foi permitido que o meio fosse solidificado à temperatura ambiente durante 30 minutos; sob a capela de fluxo, e as placas foram incubadas em posição invertida por 10 dias a 32 °C - 5% CO₂. A segunda camada do mesmo meio suplementado com 0,01% de vermelho neutro foi em seguida, adicionada e placas foram incubadas por mais uma noite a 32 °C. Placas pequenas
- 20

foram isoladas e colhidas de seis poços sob condições estéreis usando uma micropipeta equipada com uma ponteira de 0,1 ml, e transferida para tubos estéreis contendo 0,2 ml de MEM - 4% FCS: três passagens P3 (identificados como clones 31, 32 e 33) e três da passagem P4 (identificado como clones 71,72 e 73). A
 5 suspensão foi homogeneizada em vortex, diluída serialmente no mesmo meio, e utilizada imediatamente para infectar 6 poços em placas de células Vero. O protocolo foi repetido e uma segunda coleta de dois SP foi realizada nos clones 32, 33, 71 e 72, e uma SP no clone 31. Cada placa coletada foi diluída em 1 ml de meio, antes da amplificação em células Vero, em frascos T25 cm². O meio de
 10 cultura foi colhido no dia 6 após a infecção, diluído com o mesmo volume de uma solução aquosa tamponada contendo agente crioprotetor (pH 7,5) e congelados a -70 °C. Todas estas etapas foram realizadas a 32 °C.

Vírus de placas purificadas foram denominados 311, 321, 322, 331, 332, 341, 342, 351, 352, 711, 712, 721 e 722, respectivamente.

15 O títulos de infecção foram determinados em células Vero (vide abaixo):

Clone 311: 3.95 LogCCID ₅₀ /ml	
Clone 321: 5.20 LogCCID ₅₀ /ml	Clone 322: 5.45 LogCCID ₅₀ /ml
Clone 331: 5.55 LogCCID ₅₀ /ml	Clone 332: 4.95 LogCCID ₅₀ /ml
20 Clone 341: 2.80 LogCCID ₅₀ /ml	Clone 342: 4.85 LogCCID ₅₀ /ml
Clone 351: 5.35 LogCCID ₅₀ /ml	Clone 352: 5.50 LogCCID ₅₀ /ml
Clone 711: 5.45 LogCCID ₅₀ /ml	Clone 712: 5.65 LogCCID ₅₀ /ml
Clone 721: 5.30 LogCCID ₅₀ /ml	Clone 722: 5.60 LogCCID ₅₀ /ml

Uma segunda amplificação em células Vero foi realizada por três
 25 clonagens: clones 331, 352 e 722.

Os sobrenadantes das culturas foram coletadas no dia 8 após a infecção, diluído 1/2 com uma solução aquosa tamponada contendo agente crioprotetor (pH 7,5) e denominado TV331, TV352, TV722.

1.5 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS CLONADO

Após a 1ª amplificação, todos os vírus amplificados exibiram o mesmo tamanho de placa, fenótipo e título equivalentes a, ou superior a 5 logCCID₅₀/ml (exceto os clones 311 e 341 que foram significativamente menores). O Seqüenciamento das posições específicas de atenuação foi realizado em 6 clones a partir da 1ª amplificação (clone 321, 331, 351, 352, 711, 721) e os três clones a partir do 2ª amplificação, e não revelaram qualquer mutação.

Na ausência de qualquer diferença significativa entre os clones, o TV722 foi selecionado e amplificado em células VERO, a fim de gerar uma cepa candidata a vacina VDV2.

TABELA 5:

SEQÜENCIAMENTO DE SÍTIOS ESPECÍFICOS DE ATENUAÇÃO DOS VÍRUS DEN-2.

Etapa/Célula	Vírus	5'-UTR	prM	E	NS1	NS2 a	NS3	NS4 A	NS5
		57	524	2055	2579	4018	5270	5547	6599 8571
Tipo-selvagem/PG MK	16681	C	A	C	G	C	A	T	G C
Vacina/PDK	PDK53	T	T	T	A	T	A/T	C	C T
2º Purificação /VERO	TV 321	T	T	T	A	T	A	C	C T
	TV 331	T	T	T	A	T	A	c	C T
	TV 342	T	T	T	A	T	A	c	C T
	TV 352	T	T	T	A	T	A	c	C T
	TV 711	T	T	T	A	T	A	c	C T
	TV 722	T	T	T	A	T	A	c	C T
2ª amplificação /VERO	TV722 PM	T	T	T	A	T	A	c	C T

A posição dos nucleotídeos está indicada abaixo cada gene e referidos para a sequência publicada da cepa DEN-2 16681.

Em conclusão, um número total de 11 passagens foi necessário para se obter o clone biológico de DEN-2 16681/PDK50 adaptada em células VERO.

5 Outras caracterizações foram realizadas, em seguida, pela determinação da sequência e testes fenotípicos da VDV2 passagem 11.

EXEMPLO 2

SEQÜENCIAMENTO

A sequência completa do vírus foi gerada, de acordo com a
10 seguinte estratégia. O RNA genômico foi extraído e purificado. O genoma completo foi amplificado por 16 reações de RT-PCR sobrepostas. Cada PCR foi concebido de modo que para que as marcações de seqüenciamento fosse adicionada a cada fita de DNA. Isto permitiu simplificar as reações de seqüenciamento, dirigindo todos movidos para
15 um único par de primers universais de seqüenciamento. Cada produto de PCR foi individualmente seqüenciado em ambas as fitas de DNA. Todos os resultados foram remontados para reconstruir o genoma completo da VDV2.

2.1 MATERIAIS

2.1.1 VÍRUS

20 Os vírus aos quais estão aqui mencionados são DEN-2 16681; LAV-2/PDK53; VDV2, as seqüências das quais são dadas na lista de seqüência anexa.

O texto completo da seqüência genômica destes vírus é de 10723
25 nucleotídeos de comprimento.

2.1.2 PRIMERS

Todos os primers foram projetados no *Seqweb bioinformatics package* (Accelrys), módulo de desenho de primers (Tabela 6).

Nome	Sequência do Primers	Nt Inicial	Nt Final	Comprimento do Primer	Comprimento do RT - PCR	Superposição
D2 01 +	GTTTCCCAGTCACGACacgtgaccgacaagaacag (SEQ ID No.4)	13	32	37	978	-32
D2 01 -	AACAGCTATGACCATGtctctgaaaccccttcc (SEQ ID No.5)	991	972	36		371
D2 02 +	GTTTCCCAGTCACGACatcaagtagtctccc (SEQ ID No.6)	583	601	36	949	
D2 02 -	AACAGCTATGACCATGagcaacacatctcattgaag (SEQ ID No.7)	1532	1512	37		163
D2 03 +	GTTTCCCAGTCACGACtgcaacagaaaacttgaatacac (SEQ ID No.8)	1325	1349	42	948	
D2 03 -	AACAGCTATGACCATGgctccatagattgctccaaagac (SEQ ID No.9)	2273	2251	39		203
D2 04 +	GTTTCCCAGTCACGACcccagtcacatagaaagcagaacc (SEQ ID No.10)	2025	2048	41	878	
D2 04 -	AACAGCTATGACCATGcacaagccatagttctcaacttcc (SEQ ID No.11)	2903	2880	40		155
D2 05 +	GTTTCCCAGTCACGACatcatgcaggcaggaacaaac (SEQ ID No.12)	2707	2725	36	949	
D2 05 -	AACAGCTATGACCATGaccataaccatcactcttccc (SEQ ID No.13)	3656	3636	37		240
D2 06 +	AACAGCTATGACCATGaccataaccatcactcttccc (SEQ ID No.14)	3368	3386	36	930	
D2 06 -	AACAGCTATGACCATGgctctctcagttccaaatc (SEQ ID No.15)	4298	4279	36		146
D2 07 +	GTTTCCCAGTCACGACaagaaccagcaagaaaggag (SEQ ID No.16)	4113	4133	38	868	
D2 07 -	AACAGCTATGACCATGcaccattaccataaagaccac (SEQ ID No.17)	4981	4960	38		226
D2 08 +	GTTTCCCAGTCACGACtgaaccataatggcgagac (SEQ ID No.18)	4715	4734	37	910	
D2 08 -	AACAGCTATGACCATGtctctgttttacttggaaacgac (SEQ ID No.19)	5625	5601	41		208
D2 09 +	GTTTCCCAGTCACGACaagccatttcacagacc (SEQ ID No.20)	5375	5393	36	920	
D2 09 -	AACAGCTATGACCATGtcaatttctcttcccttccc (SEQ ID No.21)	6295	6274	38		158
D2 10 +	GTTTCCCAGTCACGACgagaggagaagcaaggaaac (SEQ ID No.22)	6096	6116	38	923	
D2 10 -	AACAGCTATGACCATGaggacacattcactgagg (SEQ ID No.23)	7019	7001	35		233
D2 11 +	GTTTCCCAGTCACGACacagagaacaccccacagac (SEQ ID No.24)	6750	6768	36	929	
D2 11 -	AACAGCTATGACCATGtccactctctgattccac (SEQ ID No.25)	7679	7661	35		308
D2 12 +	GTTTCCCAGTCACGACacaagtaatgctctagtcctc (SEQ ID No.26)	7332	7353	39	935	
D2 12 -	AACAGCTATGACCATGtccactgatacactatgttc (SEQ ID No.27)	8267	8246	38		211
D2 13 +	GTTTCCCAGTCACGACgtcatcacaaatccacag (SEQ ID No.28)	8016	8035	37	937	
D2 13 -	AACAGCTATGACCATGgcttctctctcttcttccatc (SEQ ID No.29)	8953	8931	39		140
D2 14 +	GTTTCCCAGTCACGACaagtgagaagcaatgcag (SEQ ID No.30)	8773	8791	36	937	
D2 14 -	AACAGCTATGACCATGtgaaatggttgaaacagaag (SEQ ID No.31)	9710	9690	37		209
D2 15 +	GTTTCCCAGTCACGACgcaattcagcaactaaacatcac (SEQ ID No.32)	9641	9482	39	9335	
D2 15 -	AACAGCTATGACCATGggcatttatgatggcctgac (SEQ ID No.33)	10396	10377	36		-
D2 16i +	ccatggaagctgtacgc (SEQ ID No.34)	10480	10496	64	234	
D2 16i -	AACAGCTATGACCATGtgattcaacagcaccattcc (SEQ ID No.35)	10714	10695	36		-28

2.2 MÉTODOS

2.2.1 PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

A partir de experiências anteriores, um mínimo de 1000 DICC₅₀ é necessário para obter uma reação de RT-PCR positiva nas próximas etapas. Isto significa que um título mínimo de 10⁴ DICC₅₀/mL de vírus é necessário. O RNA genômico viral foi purificado utilizando o kit QIAamp viral RNA mini (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, um volume de 140 µL de uma amostra viral bruta foi incubada na presença de uma solução de lise, e carregado em um kit de coluna. Após a etapa de lavagem, o RNA viral foi purificado e eluídos em 60 µL de água estéril livre de nuclease contendo 1 µL de inibidor de RNase (40 unidades) (RNase Out, Sigma).

2.2.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA viral foi reversamente transcrito em cDNA por uma transcriptase reversa (reverse iT) da ABGene. Novamente, foram aplicadas condições padrão de uso, utilizando 10 µL de RNA purificado, em uma volume final de reação de 20 µL. A reação foi iniciada por hibridização sem os primers. Uma reação de RT foi realizada por PCR. A síntese de cDNA foi obtida pela incubação de 45 minutos a 47°C.

2.2.3 PCR

Todas as reações de PCR foram realizadas com o sistema Expand High Fidelity PCR (Roche Diagnostics), utilizando todos os 16 pares de primers (+) e (-) da Tabela 6. As condições de PCR foram as seguintes:

RT	2µl	<u>Programa de PCR</u>			
Tampão 10x	2.5µl	Desnaturação	94°C	2 min	
dNTP mix				15	
(10mM)	2µl	Desnaturação	94°C	seg	
Primers	0.8µl cada	Hibridização	55°C	30	40
				seg	ciclos

RT	2µl	<u>Programa de PCR</u>		
H ₂ O	16.4µl	Extensão	68°C	1 min
Enzima	0.5µl	Extensão	68°C	5 min

Todos os produtos do PCR foram controlados pela eletroforese em gel de agarose.

2.2.4 SEQÜENCIAMENTO

A maior parte das reações de seqüenciamento foi terceirizada pela Genome Express. As extremidades genômicas, ambigüidades, alguns cruzamentos inter-PCR, e regiões não seqüenciadas pela Genome Express, por razões técnicas, foram realizados "*in-house*".

Seqüenciamento da Genome Express: Os produtos de PCR foram enviados a +4 °C, e os resultados do seqüenciamento foram recebidos como arquivos de seqüências informatizadas. O arquivo texto, cromatogramas de qualidade e arquivos estão disponíveis para cada seqüência. Após o alinhamento da seqüência, todas as discrepâncias foram verificadas no cromatograma, e corrigidas se fossem identificados erros no método de cálculo da seqüência.

Seqüenciamento realizado internamente "*in-house*": As reações de Seqüenciamento foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com o kit Sequitherm Excel II LC (Epicentre). Cada produto de PCR foi seqüenciado em ambas as fitas, de forma independente, em uma única reação. As reações foram carregadas em um gel de eletroforese de seqüenciamento. A execução e a análise da seqüência foram realizadas no seqüenciador automatizado Gene ReadIR 4200 (Li-Cor).

REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

DNA	Até 200/250 ng	<u>Programa de PCR</u>		
Tampão de Reação	7.2µl	Desnaturação	92°C	2 min
Primers (1-2 pM)	1.5µl cada	Desnaturação	92°C	15 seg

DNA	Até 200/250 ng	<u>Programa de PCR</u>			
Enzima	1µl	Hibridização	50°C	30 seg	30 ciclos
H ₂ O	Até 20µl	Extensão	70°C	1 min	
		Extensão	70°C	10 seg	

Adição de 3 µL de tampão desnaturante/carregamento.

Desnaturação das amostras 3 minutos a 95 °C e resfriamento em gelo pouco antes do carregamento das amostras.

ELETROFORESE DE SEQÜENCIAMENTO

<u>Parâmetros da eletroforese</u>		<u>Parâmetros do Gel</u>	
Voltagem	1500 V	Tamanho do Gel	41 cm
Corrente	35 mA	Espessura do Gel	0,2 mm
Força	40 W	Temperatura	45°C
Tempo de Corrida	9H00	Velocidade varredura	3

5

2.3 RESULTADOS

Todos PCR fragmentos foram seqüenciados de ambas as extremidades usando PCR comum acrescentado a cauda, ou seja, um motivo específico, que foi acrescentada no 5' terminal de todos os primers:

Primers 5': M13SEQ-GTTTTCCCAGTCACGAC (SEQ ID N°.36)

10

Primers 3': M13REV-AACAGCTATGACCATG (SEQ ID N°.37)

M13-SEQ e seqüências REV correspondem aos motivos de primers universais M13 (New England Biolabs references).

15

Para o contíguo de montagem, uma rápida análise foi realizada no Vector NTi, no módulo ContigExpress (Informax). A seqüência referência da cepa LAV2 foi comparada com todos os resultados de seqüenciamento individuais. Em tais condições, todos os resultados poderiam ser alinhados ao lugar correto no genoma completo, mesmo quando algumas regiões ainda

estavam sem o contíguo de montagem, dando uma rápida visualização de todo o alinhamento genômico.

2.3.1 MONTAGEM DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DE VDV2

A seqüência de alinhamento final foi realizada no módulo Vector NTi, AlignX (Informax). O algoritmo clássico de alinhamento de seqüências múltiplas ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) foi usado pelo software para construir o alinhamento global. Todos os resultados foram alinhados a seqüência juntamente com a seqüência referência de LAV2, permitindo assim uma melhor reconstrução do genoma. Qualquer discrepância na seqüência em relação à referência exigiu uma confirmação independente sobre outra reação de seqüenciamento. A seqüência completa de VDV2 é demonstrada na SEQ ID Nº.1.

Algumas ambigüidades são freqüentemente encontradas em seqüências únicas, especialmente próximas as extremidades das seqüências. Isto é algo inerente à má qualidade da reação em ambas as extremidades de qualquer fragmento de PCR. Estas seqüências de má qualidade foram excluídas do alinhamento, enquanto outras duas reações de seqüenciamento independentes eram disponíveis a partir de outros produtos de PCR. A discrepância sobre as seqüências de referência não foram levadas em conta no alinhamento final quando estas não foram confirmadas por pelo menos duas outras seqüências independentes de PCR de consenso compatível. Inversamente, qualquer discrepância confirmada em duas seqüências independente foram mantidas no último seqüenciamento.

A Tabela 7 sumariza as características de cada reação de seqüenciamento, indicando o início, fim e a duração. As sobreposições entre PCR adjacentes também estão indicados, assim como as diferenças em relação à seqüência de referência na última coluna.

**TABELA 7 CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DO
VÍRUS DA DENGUE VDV2**

Nome	Início	Fim	Tamanho	Superposição	Comentários
D2 01 +	33	365	332	0	2 seqüências
D2 01-	619	79	540	5	2 cipoenses
D2 02 +	614	1334	720		736 G>C (M9-G>R)
D2 02-	1488	654	834	127	736 G>C (M9-G>R)
D2 03 +	1361	2135	774		1619 G>A (E228 G>E); 1638 A>G (E234K s)
D2 03-	2227	1416	811	179	1619 G>A (E228 G>E); 1638 A>G (E234K s)
D2 04 +	2048	2774	726		2520G>A(NS1-33Ks)
D2 04-	2866	2210	656	133	2520G>A(NS1-33Ks)
D2 05 +	2733	3495	762		
D2 05-	3619	2819	800	251	
D2 06 +	3393	4196	803		
D2 06-	4257	3368	889	78	
D2 07 +	4179	4830	651		4723 T>A (NS3-69 S>T)
D2 07-	4851	4223	628	130	4723 T>A (NS3-69 S>T)
D2 08 +	4742	5506	764		5062 G>C (NS3-181 DD>H)
D2 08-	5582	4721	861	188	5062G>C(NS3-181 DD>H)
D2 09 +	5394	6100	706		
D2 09-	6669	5979	690	545	
D2 10 +	6124	6996	872		
D2 10-	6983	6148	835	218	
D2 11 +	6778	7567	789		
D2 11-	7649	6781	868	317	
D2 12 +	7365	8236	971		
D2 12-	8241	7332	909	191	
D2 13 +	8050	8797	747		
D2 13-	8819	8147	672	22	
D2 14 +	8707	9700	903		9191 G>A (NS5-541 R>K); 9222 A>G (NS5-551 Es)
D2 14-	9654	8804	850	199	9191 G>A (NS5-541 R>K); 9222 A>G (NS5-551 E s)
D2 15 +	9501	10285	784		10063 T>A (NS5-832 S>T)
D2 15-	10347	9702	645	187	10063 T>A (NS5-832 S>T)
D2 16i +	10486	10687	201		10507 A>G
D2 16i -	10694	10160	534	0	10507 A>G

As duas extremidades do genoma não poderiam ser seqüenciadas a partir da amplificação por PCR, porque a síntese de cDNA e a reação de PCR DNA necessitam de oligonucleotídeos complementares para as extremidades do genoma. Durante a etapa de amplificação, estes oligonucleotídeos são incorporadas ao fragmento de PCR. O resultado da seqüência é da seqüência de oligonucleotídeo sintético, e não a do próprio vírus. O PCR em ambas as extremidades do genoma do vírus não funcionam corretamente, o que sugere que a seqüência do vírus não foi significativamente diferente da seqüência de oligonucleotídeo (se tivesse sido o caso, a amplificação por PCR deveria ter fracassado ou, pelo menos, deveria ter sido de má qualidade). Não fomos capazes de distinguir as duas extremidades do genoma de todas as outras amplificações por PCR. Portanto, no genoma reconstruído, ambas as extremidades do genoma foram consideradas como idênticas às seqüências de oligonucleotídeos (e também idênticas a seqüência de referência). No 5' terminal, é a seqüência dos nucleotídeos de 1 a 32. No 3' terminal, é a seqüência dos nucleotídeos de 10695 a 10723.

2.3.2 COMPARAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS

Dez diferenças de nucleotídeos foram detectadas com relação à seqüência genômica entre as cepas da LAV2 de origem. A cepa VDV2 vacinal é derivada da LAV2, através da "sanitização" viral e da passagem de células de cão para células de macaco.

As diferenças entre LAV2 e VDV2 podem ter várias origens. Primeiro, as etapas de clonagem podem eleger uma sub-população viral que não é 100% idêntica à seqüência maior anteriormente detectada na cepa LAV2. Em segundo lugar, LAV2 foi produzida em células PDK, enquanto VDV2 foi produzida em células Vero. Essa passagem de células de cão para células de macaco induz potencialmente a mudanças virais que refletem a adaptação à nova linhagem celular. Em terceiro lugar, como para todos os vírus RNA, a

menor fidelidade da RNA polimerase viral desencadeia uma maior taxa de mutação genômica do que a DNA polimerase.

Em termos de seqüências todas 9 posições de nucleotídeos ligadas a atenuação viral da LAV2 estavam conservadas na VDV2 passagem 11.

- 5 Além disso, a comparação das seqüências entre a cepa VDV2 passagem 9 e passagem 11 demonstrou a ocorrência de duas mutações entre estas passagens, que estão ligadas às diferenças de fenótipo, viremia e imunogenicidade.

TABELA 8:

10 **COMPARAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS ENTRE A CEPA LAV2/PDK53 E AS CEPAS VDV2**

PASSAGEM 9 E 11.

Nucleotídeos				Aminoácidos				
Posição	LAV2	VDV2		Região	Posição	LAV2	VDV2	
		Passagem 9	Passagem 11				Passagem 9	Passagem 11
736	G	G	C	M	9	G	G	R
1619	A	A	A	E	228	G	E	E
1638	A	G	G	E	234	K	K	K
2520	G	A	A	NS1	33	K	K	K
4723	T	A	A	NS3	69	S	T	T
5062	G	C	C	NS3	181	D	H	H
5270	A/T	A	A	NS3	250	E/V	V	V
9191	G	G	A	NS5	541	R	R	K
9222	A	G	G	NS5	551	E	E	E
10063	T	A	A	NS5	832	S	T	T
1057	A	G	G	3' nc	-	-	-	-

Negrito: Diferenças entre as seqüências VDV2 passagem 9 e passagem 11

- 15 Ao realizar o alinhamento da seqüência entre todas as seqüências genômicas do sorotipo-2 da dengue disponíveis no Genbank, parece que, apenas duas posições são partilhadas por outras cepas da dengue-2 (1638 e 2520), ambas em substituições silenciosas de aminoácido. Todas as outras posições são específicas para as cepas VDV2 passagem 11, que desencadeia uma substituição aminoácido (Tabela 8). Em relação as mudanças de aminoácido, as quatro alterações de peptídeos não-estruturais parecem
- 20 relativamente conservadoras, do ponto de vista bioquímico, em que as duas

alterações em M e no envelope trazem modificações tanto na carga quanto na hidrofobicidade.

EXEMPLO 3

CARACTERIZAÇÃO

5 O objetivo destes estudos foi avaliar se mudanças nos marcadores de atenuação ocorreu através das passagens.

O fluxograma mostrado na Figura 2 sumariza o aperfeiçoamento do processo de manufatura que dá origem ao Produto Completo (monovalente), em dose "pronta para o uso".

10 Resumidamente, após 2 passagens sucessivas da VDV2 passagem 8 em células Vero, as respectivas sementes de trabalho (working seeds) foram obtidas. Os cultivos finais dos vírus também foram conduzidos por infecção de uma suspensão de células Vero. Os vírus produzidos são em seguida colhidos. O ácido desoxirribonucléico (DNA) foi digerido, de acordo
15 com um tratamento enzimático. As impurezas foram removidas por ultrafiltração. Títulos de Infecção foram aumentados por uma etapa de concentração. Uma solução aquosa tamponada contendo agentes crioprotetor (pH = 7,5) é adicionado e esta mistura é filtrada em coluna de 0,22 µm e então diluída na dose desejada dentro da mesma solução. A substância ativa é,
20 então, colocada em frascos de vidro, congeladas à seco, e armazenada antes de ser utilizada.

3.1 MARCADORES FENOTÍPICOS

A Tabela 9 apresenta dados de três ensaios fenotípicos realizados nas cepas DEN-2 16681 wt, DEN-2 16681/PDK53 vacinal, VDV2
25 passagem 9 e VDV2 passagem 11 (última passagem de adaptação): a sensibilidade a temperatura (Ts), a curva de crescimento em células de macaco (Vero) e mosquitos (C6/36) e neurovirulência em camundongos recém-nascidos (dados obtidos no CDC). A redução da neurovirulência no

camundongo (redução da mortalidade e maior tempo de sobrevivência média (AST)), crescimento limitado a 39 °C e restrição de replicação em células C6/36 são atualmente aceitas pela comunidade científica como critérios de atenuação do vírus da dengue. Passagens de vírus adaptados em células Vero demonstram evidente perfil de Ts, e são mais restritas do que as cepas DEN2/PDK53. A passagem de adaptação final foi restringida por cerca de 3 Log neste ensaio. A sensibilidade a temperatura também foi confirmada pela curva de crescimento viral. Em células Vero, níveis de replicação semelhantes foram observados em todos os vírus testados. Em células de mosquitos, o crescimento de vírus adaptados em células Vero foi nitidamente restringido (aproximadamente 3 Log), em comparação com DEN2- wt, e pouco restrito (cerca de 0,5 Log), em comparação com DEN2-PDK53. Surpreendentemente, a neurovirulência dos vírus Vero-adaptado foi próxima a neurovirulência do DEN2-wt, e significativamente maior que a neurovirulência do DEN2/PDK53 vacinal. Estes dados apontam o menor valor preditivo desta afirmação, em relação a atenuação da cepa (cf. dados clínicos).

Distribuição do tamanho da Placa da cepa VDV2 passagens 9 e 11, DEN2/PDK53 e wtDEN2 são comparadas na figura 5. A cepa wt DEN2 apresenta um perfil heterogêneo com 95% das placas com um perfil de tamanho homogêneo, com uma grande população (81%) de placas <0,6 mm e um menor população (12%) de placas com 1-2 mm. Este perfil é distinto do perfil da DEN2-PDK53 perfil. Destacamos que, na passagem de adaptação intermediária, VDV2 P9, exibe um perfil heterogêneo, com uma grande população (70%) de placas com 1-2 mm, e um menor população (25%) das placas <0,6 mm. Estes dados demonstram que a cepa VDV2 ainda não está totalmente adaptada na passagem 9, e que as duas outras passagens foram necessárias para obtenção de uma população homogênea de replicação estável em células Vero.

TABELA 9:
RESUMO DOS FENÓTIPOS VIRAIS DE DEN-2

Vírus	Sensibilidade à Temperatura (Percentual de redução no título a 39°C) _{vezes} de redução					Curva de Crescimento (Pico Log ₁₀ cfu/mL Vero-LS		Neurovirulência em camundongos suíços albinos recém-nascidos	
	Pontos	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Título	No Dia	Mortalidade	AST (S.D.)
D2-16681	+	Nd	92,7 _{13,7}	Nd	92,2 _{12,8}	7,5	8	100,0% ₁₆	12,0 (1,5)
D2-PDK53	+	Nd	96,6 _{29,4}	Nd	99,7 _{333,3}	7,3	8-10	43,75% ₁₆	16,0 (2,4)
VDV2 P9	+	Nd	99,94 _{1666,7}	Nd	99,97 _{3333,3}	7,5	8-10	100,0% ₁₆	10,9 (0,7)
VDV2 P11	+	Nd	99,92 _{1250,0}	Nd	99,88 ₈₃₃	7,5	10	100,0% ₁₆	10,9 (0,6)

N= número de animais

EXEMPLO 4

5

IMUNOGENICIDADE, VIREMIA, E TOXICOLOGIA EM MACACOS

Os dados mais sólidos e numerosos que podem ser obtidos em macacos referem-se a imunogenicidade e viremia. A viremia, em particular, tem sido identificada como um dos fatores associados à virulência e a gravidade da

doença nos seres humanos e, assim, constitui um parâmetro importante a ser considerado. Obviamente, a imunogenicidade é um parâmetro essencial ao testar vacinas.

Inventores estabeleceram os valores mínimo/máximo para viremia e imunogenicidade.

TABELA 10:

REQUISITOS MÍNIMOS PARA AS RESPOSTAS INDUZIDAS PELAS VACINAS CANDIDATAS DA DENGUE EM MACACOS, CONFORME MENSURADAS EM CÉLULAS VERO OU LLC-MK2 PELO ENSAIO EM PLACAS (SENDO ESTAS CÉLULAS CONSIDERADAS

EQUIVALENTES NESTE TIPO DE ENSAIO)

Duração média da viremia (Dias) (Todos os sorotipos sendo considerados)	Pico médio do título da Viremia (log 10 pfu) (Todos os sorotipos sendo considerados)	Título Médio Neutralizante Dia 30 (para cada sorotipo) PRNT 50
≤ 3 dias	≤ 1.5-2	≥ 80

pfu: Unidades formadoras de placa

PRNT 50: Neutralização com Redução de Placas Título 50 (título correspondente a uma redução de 50% do número de placas)

4.1 FARMACOLOGIA PRÉ-CLÍNICA, FARMACOCINÉTICA E PRODUTO DO METABOLISMO

EM ANIMAIS

4.1.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1.1 EXPERIMENTOS EM MACACOS

Experimentos em macacos foram efetuados de acordo com as diretrizes européias relativas à experimentação animal.

As Imunizações foram realizadas em macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) originários das Ilhas Maurício (CRP Le Vallon). Os macacos permaneceram de quarentena durante 6 semanas no biotério da

Sanofi Pasteur antes da imunização.

Os macacos foram imunizados com as vacinas por via subcutânea (SC) no braço em um volume de 0,5 ml (vide cada seção respectiva). Após anestesia leve com cetamina (Imalgene, Merial), o sangue foi colhido por punção das veias inguinal e safena. Aos dias 0 e 28, foram colhidos amostras de 5 ml de sangue para avaliar as respostas ao anticorpo enquanto que entre os dias 2 e 10 apenas 1 ml de sangue foi coletado para avaliar a viremia. O sangue foi coletado e mantido no gelo até a separação do soro. Para isso, sangue foi centrifugado durante 20 minutos a 4 °C, e soro retirado e armazenados a -80 °C até os testes no laboratório Rich Kinney. O transporte para os EUA foi realizado em gelo seco.

4.1.1.2 VIREMIA E RESPOSTAS POR ANTICORPOS NEUTRALIZANTES (TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS, PRNT)

Todas as análises foram realizadas no laboratório de R. Kinney no CDC, Fort Collins, EUA.. As amostras séricas foram transferidas e armazenadas a -80 °C até o momento do ensaio. No instante do primeiro descongelamento, as amostras foram testadas para viremia, e uma diluição de 1:5 do soro foi realizada. As diluições de 1:5 do soro foram inativados por 30 minutos a 56 °C antes do teste de neutralização do anticorpo.

4.1.1.2.1 VIREMIA

0,125 ml de soro foi adicionado a 0,125 ml de solvente (meio RPMI) no primeiro poço da placa de 96 poços e diluições seriais de 10 vezes foram feitas, transferindo de 0,025 ml em 0,225 ml do diluente para cada diluição. Diluições seriadas de 0,2 ml de $10^{0.3}$ - $10^{5.3}$ foram plaqueadas em 6 poços de placas com células Vero (o vírus foi adsorvido a 37 °C durante 1,5 horas, e coberto com 4 ml de agarose sem vermelho neutro, por 6-7 dias cobertos adicionalmente com 2 ml de Agarose contendo vermelho neutro, e então placas foram contadas). O limite de detecção do vírus foi = 10 PFU / ml.

Para o controle de estoque vacinas DEN-16681 PDK-53 (LAV2) foram plaqueadas.

4.1.1.2.2 PRNT (TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS)

Anticorpos neutralizantes foram quantificados como descrito em Huang *et al.* (2000). Resumidamente, 0,2 mL de soro inativado pelo calor, diluído 1:5 foram adicionados ao primeiro poço de placas de 96 poços e diluições seriais de 2 vezes foram feitas, transferindo de 0,1 ml em 0,1 ml de solvente (meio RPMI) para cada diluição. Isto resultou em uma diluição serial sérica de 1:10 - 1:320. 0,1 ml do vírus DEN (60-160 PFU; o vírus parental DEN1 16681) foi adicionado a cada poço de diluição sérica, com um total de 0,2 ml de mistura soro-vírus. As placas de 96 poços foram incubadas overnight a 4 °C. 0,1 ml de mistura soro-vírus (contendo 30-80 PFU da entrada do vírus) foram plaqueadas em 6 poços de placas com células Vero (conforme indicado acima na seção da Viremia) e as placas foram contadas após coloração com vermelho neutro. Múltiplas titulações da entrada viral em testes de concentrações de 2 vezes, 1-vez, e 0,5 vez fornecidos por determinação experimental direta da PFU de entrada, que foi a base para a determinação do título final de 50% (PRNT₅₀) e 70% (PRNT₇₀) de anticorpo. Um resultado soro negativo deve ter um título de anticorpos neutralizantes <1:10. Soros demonstrando um título de neutralização de 320 foram re-analisados em diluições de 1:80 a 1:2560 para a determinação do final título.

4.1.2 AVALIAÇÃO DO CANDIDATO MONOVALENTE VDV2 NA PASSAGEM 9 EM

MACACOS

A purificação/seleção do candidato VDV2 foi realizada conforme descrito no exemplo 1. Os clones selecionados (com base nas sequência e marcadores fenotípicos) foram testados após 9 passagens em cultura de células na sanofi-pasteur em macacos cinomolgos machos

(*Macaca fascicularis*, peso médio 3,1 kg), originárias da CRP Le Vallon, Ilhas Maurício.

Após a imunização em D0, a viremia foi seguida do D2 ao D10, e a imunogenicidade medida no D0 e D28. Todas as vacinas e vírus, quando na
5 forma líquida, foram mantidos a -70 °C.

LAV2: título: $10^{3,93}$ DICC₅₀/ml, liofilizado, ressuspendido em 0,5 ml de PBS (contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,133 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1g/L) e administrado na totalidade.

Passagem VDV2: DEN2 - TV722 (2 purificações em placas + 1
10 amplificação): Título: $10^{5,6}$ DICC₅₀/ml, líquido, diluído em $10^{5,3}$ pfu/ml em PBS (contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,133 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L); administrado 0,5 ml.

A injeção foi feita por via SC no braço com uma agulha 23G1, a uma dose 10^5 DICC₅₀ para VDV2.

15 Os resultados estão apresentados na Tabela 11. Titulações no dia 28 foram realizadas em triplicata (PRNT₇₀) ou em duplicata (PRNT₅₀).

A comparação entre VDV2 e LAV2 mostrou nítidas diferenças de viremia, com alta viremia de curta duração para VDV2 em 3/4 macacos, em comparação com LAV2, e imunogenicidade significativas para ambos
20 os tipos (pouco menor para VDV2). Esta viremia pode ser considerada muito alta para a VDV2 pré-mãe neste nível depois de apenas algumas passagens em células Vero. No entanto, a DEN-2 tipo selvagem (e também outros tipos) induzem a viremia de longa duração (6 a 7 dias) e intensidade (máxima de 5 Log de unidades formadoras de placas [pfu]) (Monath *et al.*,
25 2000; Bray *et al.*, 1996).

TABELA 11: IMUNOGENICIDADE DO VDV2 PASSAGEM 9

Soro	Grupo	Título dos Anticorpos Neutralizantes				Viremia (PFU/ml em células Vero)									
		Dia (-15)		Dia 28		Dia -15	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
		PRNT ₇₀	PRNT ₅₀	PRNT ₇₀	PRNT ₅₀										
AD 097	LAV DEN-2	<10	<10	80/80/160	320/160/320	0	0	0	0	0	0	5	0	50	20
AC 170		<10	<10	160/80/320	320/160/640	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0
AD 677		<10	<10	1280/640/2560	2560/1280/2560	0	5	0	0	10	50	0	5	0	0
AC 182		<10	<10	320/320/320	640/1280/1280	0	0	5	0	15	5	0	5	0	0
AC 658	VDV DEN-2	<10	<10	160/160/160	320/160/640	0	550	35	0	0	0	0	0	0	0
AC 512		<10	<10	160/80/160	160/160/160	0	1650	35	0	5	0	0	0	0	0
AD 608		<10	<10	160/320/160	320/320/320	0	1700	60	100	0	0	0	0	0	0
AD 132		<10	<10	80/80/80	80/160/160	0	70	10	0	50	10	100	0	0	0
Vírus	Exp#1	Exp#2	Exp#3												
DEN-2	60PFU	54PFU	46PFU												

4.1.3 AVALIAÇÃO DO CANDIDATO MONOVALENTE VDV2 NA PASSAGEM 11

Como a imunogenicidade das vacinas haviam sido testadas na
passagem 9, um novo experimento foi projetada para testar a passagem
monovalentes após duas passagens adicionais (passagem 10).

Macacos *Macaca fascicularis* machos, foram utilizados como
descrito anteriormente, originários da C.R.P. Le Vallon, Ilhas Maurício (24
macacos, peso médio 3,4 kg).

VDV2 Passagem 11; Lote: Título: 8,07 log₁₀ DICC₅₀/mL.

Placebo: PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺

VDV3: Vacina de cepa da dengue sorotipo 3 derivada de células
VERO, obtidos por sanitização da cepa LAV3 em células Vero.

VDV4: Vacina de cepa da dengue sorotipo 4 derivada de células
VERO, obtidos por sanitização da cepa LAV4 em células Vero.

As vacinas foram diluídas em PBS a $10^{5.3}$ DICC₅₀ /ml (contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,133 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1g/l); 0,5 ml administrado por via SC no braço com uma agulha 23G1, correspondendo a uma dose de 10^5 DICC₅₀.

5 Viremia e imunogenicidade foram medidos, como é habitual no CDC por R Kinney. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

A vacina monovalente VDV2 passagem 11 induziu uma resposta imunitária significativa, enquanto que viremia foi reduzida ou inexistente. A ausência/baixa viremia induzida pela VDV2 deve ser considerando a
10 experiência anterior, na qual a VDV2 passagem 9 induziu de forma precoce uma alta viremia. Algumas evoluções entre as passagens 9 e 11 suprimiram esta alta viremia enquanto que imunogenicidade foi mantida. A cepa VDV2 constitui, portanto, um candidato aceitável.

É de se notar que no mesmo experimento, 4 macacos foram
15 vacinados com uma formulação tetravalente envolvendo a mesma vacina VDV2 passagem 11; e nenhuma viremia foi detectada para VDV1 e VDV2 enquanto que VDV3 e VDV4 induziram a viremia.

Dois outros experimentos envolveram a administração de VDV2, isoladamente ou em combinação com os outros sorotipos.

20 No primeiro (estudo com tetravalente; 5-log de cada sorotipo), nenhuma viremia foi detectada para VDV2, e VDV1, enquanto altos níveis de viremia foram detectados para VDV3 e VDV4.

No segundo experimento, a cepa VDV2 passagem 11 foi administrada isoladamente ou dentro de uma combinação tetravalente
25 incluindo o VDV1. Quando administrado isoladamente, a cepa VDV2 passagem 11 induziu uma baixa viremia (pico 40), em apenas 1 de 4 macacos, enquanto que os 3 restantes foram negativos. Quando administrado em uma formulação tetravalente, a cepa VDV2 não induziu ou diminuiu consideravelmente a

- viremia comparado com as cepas VDV3 e VDV4, embora a VDV2 ter sido administrada em 4 Log enquanto que as cepas VDV3 e VDV4 foram administrados em 2 Log. Isto demonstra a maior segurança da cepa VDV2, na medida em que a viremia está relacionada. VDV2 monovalente cumpre assim
- 5 com sucesso os critérios inicialmente definidos em macacos.

TABELA 12: IMUNOGENICIDADE E VIREMIA DO VDV2 PASSAGEM 11

TABELA 12: IMUNOGLOBULINA E VIREMIA DO VDV21 ACUMULADA															
Macac o	Grupo	Títulos para Anticorpos Neutralizantes				Viremia (PFU/ml em células Vero)									
		Dia (-14)		Dia 29		Dia -14	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	
		PRNT ₅₀	PRNT ₇₀	PRNT ₅₀	PRNT ₅₀										
AE971	VDV DEN-2	-	-	180	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AE990		-	-	160	50	0	15	0	0	5	0	0	0	0	
AE998		-	-	905	508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AF182		-	-	285	101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Média	Homólo- go	-	-	293	119										
AE538	Placebo	-/-/-	-/-/-	2.5A- /2/2	-/-/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AE548		-/-/-	-/-/-	-/-/1/2	-/-/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AE556		-/-/1.5/2	-/-/-	1/-/-	-/-/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AE572		-/-/1.5/5	-/-/1.5/2	5/-/1/2	-/-/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Média		-/-/1.2/3	-/-/1/1	2/- /1.2/1. 6	-/-/-										
		D1/D2/ D3/D4	D1/D2/ D3/D4	D1/D 2/D 3/D4	D1/D 2/D 3/D4										

TOXICOLOGIA DA VDV2

4.2.1 TESTES DE NEUROVIRULÊNCIA EM MACACOS

- O objetivo deste ensaio foi demonstrar a falta de propriedades neurotrópicas em macacos (Ph. Eur. 2.6.18) das sementes "seeds" do vírus da dengue-2 atenuado produzidas pela Sanofi Pasteur.

- 10 macacos cinomolgos das ilhas Maurício foram inoculadas com VDV2 passagem 9 pela via intracerebral ($10^{7.10}$ CCID₅₀/mL no tálamo de cada hemisfério). No final do ensaio, os macacos foram sacrificados e perfundidos com solução de formalina. Foram colhidas amostras de tecido do cérebro de

cada macaco (medula oblongata, ponte e cerebelo, mesencéfalo, tálamo incluindo a parte esquerda e direita, córtex cerebral à esquerda e à direita). Foram feitas seções com uma espessura de 8 µm. e coradas pela eosina e galocianina.

- 5 Nenhum sinal histopatológico de patogenicidade foi observado no cérebro dos macacos injetados com semente "seed" do vírus da dengue primária sorotipo-2.

4.2.2 ESTUDO DE TOXICIDADE DE GLP (BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS) EM MACACOS CINOMOLGOS APÓS 1 ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DA VDV2 SEGUIDO POR UM PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 28 DIAS

10

O objetivo deste estudo de GLP foi avaliar as interações entre VDV2 passagem 9 e outras vacinas candidatas da dengue. A 1ª etapa do estudo foi avaliar a segurança e imunogenicidade da VDV2 antes da administração de outra vacina candidata.

15

Uma dose humana de VDV2 (aproximadamente 10^4 CCID₅₀ por dose) foi administrada por via subcutânea no Dia 0 aos macacos cinomolgos (4 machos e 4 fêmeas). Um grupo controle de 2 machos e 2 fêmeas recebeu o veículo (4% de NaCl).

20

A mortalidade, condição clínica, peso corporal e consumo alimentar foram monitorados durante todo o estudo. Temperatura corporal foi tomada depois do pré-teste, diariamente, a partir do dia de cada administração e durante 2 dias seguintes. Amostras de sangue foram coletadas para determinações clínico-laboratoriais, após o pré-teste e nos Dias 8 e 27.

25

Não se observaram quaisquer efeitos sobre os sinais clínicos, peso corporal, consumo alimentar, reações dérmicas, temperatura corporal, parâmetros clínicos hematológicos, químicos, ou peso dos órgãos. Nenhuma morte foi relatada durante o estudo.

Em conclusão, a administração subcutânea da VDV2 nos

macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*), na dose testada não afetou adversamente a saúde dos macacos, como avaliada pelas observações clínicas em vida e pela patologia clínica.

EXEMPLO 5

5 SEGURANÇA DO VDV2 MONOVALENTE EM ADULTOS SAUDÁVEIS, FLAVIVIRUS NAIVE COM IDADE ENTRE 18 E 40 ANOS

O propósito deste estudo fase 1 é documentar os perfis de segurança, viremia, e imunogenicidade do VDV2 passagem 11 monovalente em uma concentração de vírus de 10^4 CCID₅₀ comparado com Stamaril®
10 (usados como grupo controle), em adultos sem precedentes de tratamento para *Flavivirus* (naive). Injeções únicas são dadas, dando o seguimento a 6 e 12 meses. Por precaução da segurança, são realizadas no estudo inclusões seqüenciais.

A inclusão no estudo e as vacinações são assim escalonadas; um
15 1º coorte (n = 4 por grupo, n total = 12) foi vacinado. A segurança dos dados coletados até o dia 28 foi analisada por um Comitê de Acompanhamento de Dados Independente (IDMC) e pela Royal Adelaide Hospital Investigational Drugs Subcommittee (IDSC) antes de se tomar a decisão de continuar com a vacinação dos indivíduos restantes (n = 8 por grupo, n total = 16). A
20 representação esquemática do desenho do estudo é fornecida na figura 6.

Após a administração da vacina os pacientes são regularmente submetidos a vários testes e exames clínicos. Um resumo deste seguimento é indicado na tabela 13 abaixo.

A população incluída é constituída por adultos com idades
25 compreendidas entre 18 e 40 anos (ou seja, do dia do 18º aniversário às vésperas do 41º aniversário), no dia da inclusão que não possuem precedentes de tratamento para o *Flavivirus* (naive) (foram excluídas pessoas apresentando vacinação contra doenças causadas por *Flavivirus* (por exemplo, febre

- amarela, encefalite japonesa, dengue); ou com história de infecção por *Flavivirus* (confirmado clinicamente, sorologicamente ou microbiologicamente) ou que residiram previamente ou viajaram para áreas com elevada endemicidade de infecção (independentemente da duração), ou tiveram
- 5 residência ou viajaram para o norte de Queensland durante 2 semanas ou mais).

TABELA 13: FLUXOGRAMA DE ACOMPANHAMENTO

Número da Visita	V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09	V10	V11	V12	
Tempo de estudo	D0	D2	D4	D6	D8	D10	D12	D14	D16	D28	D180	D365	
Janela de tempo							±1d	±1d			±4d	±15d	±30d
Exame Clínico	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
Sinais Vitais(BP, pulso)	√												
Temperatura Oral	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√			
Amostra de Sangue:													
-													
SorilogiaHBV/HCV/HIV													
-Segurança Biológica	√		√		√		√		√	√			
-Viremia	√	√	√	√	√	√	√	√	√				
-Imunogenicidade	√								√	√	√	√	
-Citicinas no soro	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√			
-PBMCs de células T	√									√			
(subconjunto)	√									√			
- Vigilância realizada													
Eventos Locais & sistêmicos	√												
	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	

V: visita - D: dia

- * Tempo de intervalo entre as visitas serão calculados a partir da data de vacinação do estudo, que pode ser diferente da data da visita (por exemplo, no
- 10 caso que o critério de exclusão temporária é cumprido). V06 e V07 deve ser

feita com pelo menos 1 dia de intervalo.

Os produtos testados são:

A vacina avaliada é um produto liofilizado em um frasco que é reconstituído extemporaneamente com o solvente fornecido separadamente:

5 - Ingrediente ativo: $4 \pm 0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ de cada vírus da dengue monovalente sorotipo 2 (VDV2 passagem 11) por dose de 0,5 mL;

 - Diluente: Solução de NaCl 4% estéril para a reconstituição da vacina.

 - A vacina reconstituída, ou seja, 0,5 mL de solução de NaCl 4%
10 de VDV2 monovalentes, deve ser usada imediatamente ou ser mantidas entre $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$ até o uso.

 - A dose de 0,5 mL da vacina é administrada por via subcutânea na região deltóide.

 - A vacina controle Stamaril[®], é uma vacina contra a febre
15 amarela produzida pela Aventis Pasteur. Stamaril[®] é apresentado como um pó liofilizado, livre de leucose aviária, produto estabelecido para ser reconstituído com um solvente imediatamente antes da utilização. (Ingrediente ativo: vírus vivo atenuado da febre amarela (cepa 17D): Dose letal de 50% em camundongos $\geq 1.000 \text{ (DL}_{50})$ /Diluente: solução de NaCl 4% estéril).

20 A vacina controle é administrada por via subcutânea na região deltóide.

Nenhum paciente teve síndrome clinicamente significativa relacionada com a vacinação. Um paciente apresentou febre passageira ($<38^{\circ}\text{C}$). Um paciente teve uma reação local (induração). Nenhum caso de evento
25 adverso grave relacionado com a vacina foi observado.

Todos os indivíduos apresentam uma resposta de anticorpos 28 dias após a vacinação contra a dengue-2 (título entre 1888 e 6393).

REFERÊNCIAS

- Bhamarapravati, N e Yoksan S. (1997). dengue and dengue Hemorrhagic Fever. Live attenuated tetravalent dengue vaccines, CABI Publishing, 367-379.
- 5 Burke DS e Monath TP. *Flaviviruses* (2001) In Knipe DM and Howley PM, eds. *Fields Virology* 4ª Ed. Vol 1, 1043-1125
- DeFraités RF, Smoak BL, Trofa AF, Hoke CH, Kanesa-athan N, King A, MacArthy PO, *et al.* dengue fever Among U.S. military personnel - Haiti, Setembro - Novembro, 1994. *MMWR* 1994; 43: 845-848.
- 10 Dunnen e Antonarakis (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutation*. 15:7-12; Erratum in: *Hum Mutat* 2002 ;20(5):403
- Gubler DJ. dengue. (1988) In: *Epidemiology of arthropod-borne viral disease*. Monath TPM, Editora, Boca Raton (FL):223-60
- 15 Gubler DJ, Kuno G. dengue and dengue Hemorrhagic Fever. CAB International Publishing 1997
- Gubler D. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. (2002) *TRENDS in Microbiology*. 10:100-103
- 20 Halstead SB e Simasthien P (1970). Observations related to pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. II. Antigenic and biological properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J. Biol. Med*; 42: 261-275.
- Huang *et al.* (2000). *J. Virol* 74; 3020-3028.
- 25 Jirakanjanakit N, Khin MM, Yoksan S, Bhamarapravati N. (1999) Dynamics of susceptibility and transmissibility of the live, attenuated, candidate vaccines dengue-2 PDK13, dengue-3 PGMK30F3, and dengue-4 PDK48 after oral infection in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.*, 61 (4):672-676

Kautner I, Robinson MJ, Kubnle U. (1997) dengue Virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J of Pediatrics*; 131:516-524

Monath, TP. (1994) dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci*; 91: 2395-2400.

Monath TP, Levenbook I, Soike K, Zhang ZX, Ratterree M, Draper K *et al.* (2000) Chimeric yellow fever virus 17D-Japanese encephalitis virus vaccine: dose-response effectiveness and extended safety testing in rhesus monkeys. *Journal of Virology*; 74(4): 1742-1751

Bray M, Men R, Lai CJ. (1996) Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. *J Virol*; 70(6):4162-4166

Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. (1998) dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*; 352: 971-977.

Rothman AL, Ennis FA. (1999) Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*; 257: 1-6

Sabin AB. (1952) Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*; 1:30-50

Shirtcliffe P, Cameron E, Nicholson KG, Wiselka MJ. (1998) Don't forget dengue! Clinical features of dengue fever in returning travellers. *J Roy Coll Phys Lond.*; 32: 235-237.

Thompson JD, Higgins DG, e Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.*, 22 (22), 4673-4680

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. (1997) dengue in the early

febrile phase: viremia and antibody response. *J Infect Dis*; 176: 322-30.

- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. (2000) dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Inf Dis*; 181:2-9.

WHO Technical Guide, 1986. dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control, p1-2. World Health Organization, Geneva, Suíça

- Wu S, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola J, Brachtel E, Putvatana R. (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Med*; 7:816-820

- Khin MM, Jirakanjanakit N, Yoksan S, Bhamarapravati N. (1994) Infection, dissemination, transmission, and biological attributes of dengue-2 PDK53 candidate vaccine virus after oral infection in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.*; 51(6):864-869.

<110> Sanofi Pasteur
Centers for Disease Control and Prevention

<120> CEPA ATENUADA DO VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 2

<130> BET 06P0277

<150> US 60/691274

<151> 17-06-2005

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 10723

<212> DNA

<213> Vírus da Dengue

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (10723)

<223> VDV2

<220>

<221> CDS

<222> (97) . . (10272)

<220>

```
<221> misc_feature
```

<222> (10361) .. (10361)

<223> desconhecido

<400> 1
agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaatgta 60

gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctg atg aat aac caa cgg aaa 114
Met Asn Asn Gln Arg Lys
1 5

aag gcg aaa aac acg cct ttc aat atg ctg aaa cgc gag aga aac cgc 162
Lys Ala Lys Asn Thr Pro Phe Asn Met Leu Lys Arg Glu Arg Asn Arg
10 15 20

gtg tcg act gtg caa cag ctg aca aag aga ttc tca ctt gga atg ctg 210
Val Ser Thr Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg Phe Ser Leu Gly Met Leu

cag gga cga gga cca tta aaa ctg ttc atg gcc ctg gtg gcg ttc ctt 258
Gln Gly Arg Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met Ala Leu Val Ala Phe Leu
40 45 50

cgt ttc cta aca atc cca cca aca gca ggg ata ttg aag aga tgg gga 306
Arg Phe Leu Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Lys Arg Trp Gly
55 60 65 70

aca att aaa aaa tca aaa gct att aat gtt ttg aga ggg ttc agg aaa 354
Thr Ile Lys Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val Leu Arg Gly Phe Arg Lys
75 80 85

gag att gga agg atg ctg aac atc ttg aat agg aga cgc aga tct gca 402
Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn Arg Arg Arg Arg Ser Ala
90 95 100

ggc atg atc att atg ctg att cca aca gtg atg gcg ttc cat tta acc 450

Gly	Met	Ile	Ile	Met	Leu	Ile	Pro	Thr	Val	Met	Ala	Phe	His	Leu	Thr		
		105					110					115					
aca	cgt	aac	gga	gaa	cca	cac	atg	atc	gtc	agc	aga	caa	gag	aaa	ggg	498	
Thr	Arg	Asn	Gly	Glu	Pro	His	Met	Ile	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Lys	Gly		
	120					125					130						
aaa	agt	ctt	ctg	ttt	aaa	aca	gag	gtt	ggc	gtg	aac	atg	tgt	acc	ctc	546	
Lys	Ser	Leu	Leu	Phe	Lys	Thr	Glu	Val	Gly	Val	Asn	Met	Cys	Thr	Leu		
	135				140					145					150		
atg	gcc	atg	gac	ctt	ggg	gaa	ttg	tgt	gaa	gac	aca	atc	acg	tac	aag	594	
Met	Ala	Met	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Glu	Asp	Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys		
				155					160					165			
tgt	ccc	ctt	ctc	agg	cag	aat	gag	cca	gaa	gac	ata	gac	tgt	tgg	tgc	642	
Cys	Pro	Leu	Leu	Arg	Gln	Asn	Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp	Cys	Trp	Cys		
			170					175					180				
aac	tct	acg	tcc	acg	tgg	gta	act	tat	ggg	acg	tgt	acc	acc	atg	gga	690	
Asn	Ser	Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Thr	Tyr	Gly	Thr	Cys	Thr	Thr	Met	Gly		
		185					190					195					
gaa	cat	aga	aga	gaa	aaa	aga	tca	gtg	gca	ctc	gtt	cca	cat	gtg	cga	738	
Glu	His	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Pro	His	Val	Arg		
	200					205					210						
atg	gga	ctg	gag	aca	cga	act	gaa	aca	tgg	atg	tca	tca	gaa	ggg	gcc	786	
Met	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Thr	Glu	Thr	Trp	Met	Ser	Ser	Glu	Gly	Ala		
	215				220					225					230		
tgg	aaa	cat	gtc	cag	aga	att	gaa	act	tgg	atc	ttg	aga	cat	cca	ggc	834	
Trp	Lys	His	Val	Gln	Arg	Ile	Glu	Thr	Trp	Ile	Leu	Arg	His	Pro	Gly		
				235					240					245			
ttc	acc	atg	atg	gca	gca	atc	ctg	gca	tac	acc	ata	gga	acg	aca	cat	882	
Phe	Thr	Met	Met	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Tyr	Thr	Ile	Gly	Thr	Thr	His		
			250					255					260				
ttc	caa	aga	gcc	ctg	att	ttc	atc	tta	ctg	aca	gct	gtc	act	cct	tca	930	
Phe	Gln	Arg	Ala	Leu	Ile	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Thr	Pro	Ser		
		265				270						275					
atg	aca	atg	cgt	tgc	ata	gga	atg	tca	aat	aga	gac	ttt	gtg	gaa	ggg	978	
Met	Thr	Met	Arg	Cys	Ile	Gly	Met	Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Gly		
	280				285					290							
gtt	tca	gga	gga	agc	tgg	gtt	gac	ata	gtc	tta	gaa	cat	gga	agc	tgt	1026	
Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Trp	Val	Asp	Ile	Val	Leu	Glu	His	Gly	Ser	Cys		
	295				300					305					310		
gtg	acg	acg	atg	gca	aaa	aac	aaa	cca	aca	ttg	gat	ttt	gaa	ctg	ata	1074	
Val	Thr	Thr	Met	Ala	Lys	Asn	Lys	Pro	Thr	Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Ile		
				315					320					325			
aaa	aca	gaa	gcc	aaa	cag	cct	gcc	acc	cta	agg	aag	tac	tgt	ata	gag	1122	
Lys	Thr	Glu	Ala	Lys	Gln	Pro	Ala	Thr	Leu	Arg	Lys	Tyr	Cys	Ile	Glu		
		330					335						340				
gca	aag	cta	acc	aac	aca	aca	aca	gaa	tct	cgc	tgc	cca	aca	caa	ggg	1170	
Ala	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly		
		345				350					355						
gaa	ccc	agc	cta	aat	gaa	gag	cag	gac	aaa	agg	ttc	gtc	tgc	aaa	cac	1218	
Glu	Pro	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Cys	Lys	His		
	360				365					370							
tcc	atg	gta	gac	aga	gga	tgg	gga	aat	gga	tgt	gga	cta	ttt	gga	aag	1266	

Ser 375	Met	Val	Asp	Arg	Gly 380	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys 385	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys 390	
gga Gly	ggc Gly	att Ile	gtg Val	acc Thr 395	tgt Cys	gct Ala	atg Met	ttc Phe	aga Arg 400	tgc Cys	aaa Lys	aag Lys	aac Asn	atg Met 405	gaa Glu	1314
gga Gly	aaa Lys	gtt Val	gtg Val 410	caa Gln	cca Pro	gaa Glu	aac Asn	ttg Leu 415	gaa Glu	tac Tyr	acc Thr	att Ile	gtg Val 420	ata Ile	aca Thr	1362
cct Pro	cac His	tca Ser 425	ggg Gly	gaa Glu	gag Glu	cat His	gca Ala 430	gtc Val	gga Gly	aat Asn	gac Asp	aca Thr 435	gga Gly	aaa Lys	cat His	1410
ggc Gly	aag Lys 440	gaa Glu	atc Ile	aaa Lys	ata Ile	aca Thr 445	cca Pro	cag Gln	agt Ser	tcc Ser	atc Ile 450	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	gaa Glu	1458
ttg Leu 455	aca Thr	ggc Gly	tat Tyr	ggc Gly	act Thr 460	gtc Val	aca Thr	atg Met	gag Glu	tgc Cys 465	tct Ser	cca Pro	aga Arg	acg Thr	ggc Gly 470	1506
ctc Leu	gac Asp	ttc Phe	aat Asn	gag Glu 475	atg Met	gtg Val	ttg Leu	ctg Leu	cag Gln 480	atg Met	gaa Glu	aat Asn	aaa Lys	gct Ala 485	tgg Trp	1554
ctg Leu	gtg Val	cac His	agg Arg 490	caa Gln	tgg Trp	ttc Phe	cta Leu	gac Asp 495	ctg Leu	ccg Pro	tta Leu	cca Pro	tgg Trp 500	ttg Leu	ccc Pro	1602
gga Gly	gcg Ala	gac Asp 505	aca Thr	caa Gln	gag Glu	tca Ser	aat Asn 510	tgg Trp	ata Ile	cag Gln	aag Lys	gag Glu 515	aca Thr	ttg Leu	gtc Val	1650
act Thr	ttc Phe 520	aaa Lys	aat Asn	ccc Pro	cat His	gcg Ala 525	aag Lys	aaa Lys	cag Gln	gat Asp	gtt Val 530	gtt Val	gtt Val	tta Leu	gga Gly	1698
tcc Ser 535	caa Gln	gaa Glu	ggg Gly	gcc Ala	atg Met 540	cac His	aca Thr	gca Ala	ctt Leu	aca Thr 545	ggg Gly	gcc Ala	aca Thr	gaa Glu	atc Ile 550	1746
caa Gln	atg Met	tca Ser	tca Ser	gga Gly 555	aac Asn	tta Leu	ctc Leu	ttc Phe	aca Thr 560	gga Gly	cat His	ctc Leu	aag Lys	tgc Cys 565	agg Arg	1794
ctg Leu	aga Arg	atg Met	gac Asp 570	aag Lys	cta Leu	cag Gln	ctc Leu	aaa Lys 575	gga Gly	atg Met	tca Ser	tac Tyr	tct Ser 580	atg Met	tgc Cys	1842
aca Thr	gga Gly	aag Lys 585	ttt Phe	aaa Lys	gtt Val	gtg Val	aag Lys 590	gaa Glu	ata Ile	gca Ala	gaa Glu	aca Thr 595	caa Gln	cat His	gga Gly	1890
aca Thr	ata Ile 600	gtt Val	atc Ile	aga Arg	gtg Val	caa Gln 605	tat Tyr	gaa Glu	ggg Gly	gac Asp	ggc Gly 610	tct Ser	cca Pro	tgc Cys	aag Lys	1938
atc Ile 615	cct Pro	ttt Phe	gag Glu	ata Ile	atg Met 620	gat Asp	ttg Leu	gaa Glu	aaa Lys	aga Arg 625	cat His	gtc Val	tta Leu	ggc Gly	cgc Arg 630	1986
ctg Leu	att Ile	aca Thr	gtc Val	aac Asn 635	cca Pro	att Ile	gtg Val	aca Thr	gaa Glu 640	aaa Lys	gat Asp	agc Ser	cca Pro	gtc Val 645	aac Asn	2034
ata	gaa	gca	gaa	cct	cca	ttt	gga	gac	agc	tac	atc	atc	ata	gga	gta	2082

Ile	Glu	Ala	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	
			650					655					660			
gag	ccg	gga	caa	ctg	aag	ctc	aac	tgg	ttt	aag	aaa	gga	agt	tct	atc	2130
Glu	Pro	Gly	Gln	Leu	Lys	Leu	Asn	Trp	Phe	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser	Ile	
		665					670					675				
ggc	caa	atg	ttt	gag	aca	aca	atg	agg	ggg	gcg	aag	aga	atg	gcc	att	2178
Gly	Gln	Met	Phe	Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Ala	Ile	
	680					685					690					
tta	ggt	gac	aca	gcc	tgg	gat	ttt	gga	tcc	ttg	gga	gga	gtg	ttt	aca	2226
Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Thr	
695					700					705					710	
tct	ata	gga	aag	gct	ctc	cac	caa	gtc	ttt	gga	gca	atc	tat	gga	gct	2274
Ser	Ile	Gly	Lys	Ala	Leu	His	Gln	Val	Phe	Gly	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	
				715					720					725		
gcc	ttc	agt	ggg	gtt	tca	tgg	act	atg	aaa	atc	ctc	ata	gga	gtc	att	2322
Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ser	Trp	Thr	Met	Lys	Ile	Leu	Ile	Gly	Val	Ile	
			730					735					740			
atc	aca	tgg	ata	gga	atg	aat	tca	cgc	agc	acc	tca	ctg	tct	gtg	aca	2370
Ile	Thr	Trp	Ile	Gly	Met	Asn	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	
		745					750					755				
cta	gta	ttg	gtg	gga	att	gtg	aca	ctg	tat	ttg	gga	gtc	atg	gtg	cag	2418
Leu	Val	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Val	Met	Val	Gln	
	760					765					770					
gcc	gat	agt	ggt	tgc	gtt	gtg	agc	tgg	aaa	aac	aaa	gaa	ctg	aaa	tgt	2466
Ala	Asp	Ser	Gly	Cys	Val	Val	Ser	Trp	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	Lys	Cys	
775					780					785					790	
ggc	agt	ggg	att	ttc	atc	aca	gac	aac	gtg	cac	aca	tgg	aca	gaa	caa	2514
Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Ile	Thr	Asp	Asn	Val	His	Thr	Trp	Thr	Glu	Gln	
				795					800					805		
tac	aaa	ttc	caa	cca	gaa	tcc	cct	tca	aaa	cta	gct	tca	gct	atc	cag	2562
Tyr	Lys	Phe	Gln	Pro	Glu	Ser	Pro	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Ala	Ile	Gln	
			810					815					820			
aaa	gcc	cat	gaa	gag	gac	att	tgt	gga	atc	cgc	tca	gta	aca	aga	ctg	2610
Lys	Ala	His	Glu	Glu	Asp	Ile	Cys	Gly	Ile	Arg	Ser	Val	Thr	Arg	Leu	
		825					830					835				
gag	aat	ctg	atg	tgg	aaa	caa	ata	aca	cca	gaa	ttg	aat	cac	att	cta	2658
Glu	Asn	Leu	Met	Trp	Lys	Gln	Ile	Thr	Pro	Glu	Leu	Asn	His	Ile	Leu	
	840					845					850					
tca	gaa	aat	gag	gtg	aag	tta	act	att	atg	aca	gga	gac	atc	aaa	gga	2706
Ser	Glu	Asn	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Ile	Met	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Gly	
855					860					865					870	
atc	atg	cag	gca	gga	aaa	cga	tct	ctg	cgg	cct	cag	ccc	act	gag	ctg	2754
Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Lys	Arg	Ser	Leu	Arg	Pro	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	
				875					880					885		
aag	tat	tca	tgg	aaa	aca	tgg	ggc	aaa	gca	aaa	atg	ctc	tct	aca	gag	2802
Lys	Tyr	Ser	Trp	Lys	Thr	Trp	Gly	Lys	Ala	Lys	Met	Leu	Ser	Thr	Glu	
			890					895					900			
tct	cat	aac	cag	acc	ttt	ctc	att	gat	ggc	ccc	gaa	aca	gca	gaa	tgc	2850
Ser	His	Asn	Gln	Thr	Phe	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Glu	Thr	Ala	Glu	Cys	
		905					910					915				
ccc	aac	aca	aat	aga	gct	tgg	aat	tcg	ttg	gaa	gtt	gaa	gac	tat	ggc	2898

Pro	Asn	Thr	Asn	Arg	Ala	Trp	Asn	Ser	Leu	Glu	Val	Glu	Asp	Tyr	Gly	
	920					925					930					
ttt	gga	gta	ttc	acc	acc	aat	ata	tgg	cta	aaa	ttg	aaa	gaa	aaa	cag	2946
Phe	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Asn	Ile	Trp	Leu	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Gln	
935					940					945					950	
gat	gta	ttc	tgc	gac	tca	aaa	ctc	atg	tca	gcg	gcc	ata	aaa	gac	aac	2994
Asp	Val	Phe	Cys	Asp	Ser	Lys	Leu	Met	Ser	Ala	Ala	Ile	Lys	Asp	Asn	
				955					960					965		
aga	gcc	gtc	cat	gcc	gat	atg	ggt	tat	tgg	ata	gaa	agt	gca	ctc	aat	3042
Arg	Ala	Val	His	Ala	Asp	Met	Gly	Tyr	Trp	Ile	Glu	Ser	Ala	Leu	Asn	
			970					975					980			
gac	aca	tgg	aag	ata	gag	aaa	gcc	tct	ttc	att	gaa	gtt	aaa	aac	tgc	3090
Asp	Thr	Trp	Lys	Ile	Glu	Lys	Ala	Ser	Phe	Ile	Glu	Val	Lys	Asn	Cys	
		985					990					995				
cac	tgg	cca	aaa	tca	cac	acc	ctc	tgg	agc	aat	gga	gtg	cta	gaa		3135
His	Trp	Pro	Lys	Ser	His	Thr	Leu	Trp	Ser	Asn	Gly	Val	Leu	Glu		
	1000					1005					1010					
agt	gag	atg	ata	att	cca	aag	aat	ctc	gct	gga	cca	gtg	tct	caa		3180
Ser	Glu	Met	Ile	Ile	Pro	Lys	Asn	Leu	Ala	Gly	Pro	Val	Ser	Gln		
	1015					1020					1025					
cac	aac	tat	aga	cca	ggc	tac	cat	aca	caa	ata	aca	gga	cca	tgg		3225
His	Asn	Tyr	Arg	Pro	Gly	Tyr	His	Thr	Gln	Ile	Thr	Gly	Pro	Trp		
	1030					1035					1040					
cat	cta	ggt	aag	ctt	gag	atg	gac	ttt	gat	ttc	tgt	gat	gga	aca		3270
His	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Met	Asp	Phe	Asp	Phe	Cys	Asp	Gly	Thr		
	1045					1050					1055					
aca	gtg	gta	gtg	act	gag	gac	tgc	gga	aat	aga	gga	ccc	tct	ttg		3315
Thr	Val	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Cys	Gly	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Leu		
	1060					1065					1070					
aga	aca	acc	act	gcc	tct	gga	aaa	ctc	ata	aca	gaa	tgg	tgc	tgc		3360
Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Thr	Glu	Trp	Cys	Cys		
	1075					1080					1085					
cga	tct	tgc	aca	tta	cca	ccg	cta	aga	tac	aga	ggt	gag	gat	ggg		3405
Arg	Ser	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Arg	Tyr	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly		
	1090					1095					1100					
tgc	tgg	tac	ggg	atg	gaa	atc	aga	cca	ttg	aag	gag	aaa	gaa	gag		3450
Cys	Trp	Tyr	Gly	Met	Glu	Ile	Arg	Pro	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu		
	1105					1110					1115					
aat	ttg	gtc	aac	tcc	ttg	gtc	aca	gct	gga	cat	ggg	cag	gtc	gac		3495
Asn	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Gly	His	Gly	Gln	Val	Asp		
	1120					1125					1130					
aac	ttt	tca	cta	gga	gtc	ttg	gga	atg	gca	ttg	ttc	ctg	gag	gaa		3540
Asn	Phe	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Gly	Met	Ala	Leu	Phe	Leu	Glu	Glu		
	1135					1140					1145					
atg	ctt	agg	acc	cga	gta	gga	acg	aaa	cat	gca	ata	cta	cta	gtt		3585
Met	Leu	Arg	Thr	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	His	Ala	Ile	Leu	Leu	Val		
	1150					1155					1160					
gca	gtt	tct	ttt	gtg	aca	ttg	atc	aca	ggg	aac	atg	tcc	ttt	aga		3630
Ala	Val	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Ile	Thr	Gly	Asn	Met	Ser	Phe	Arg		
	1165					1170					1175					
gac	ctg	gga	aga	gtg	atg	gtt	atg	gta	ggc	gcc	act	atg	acg	gat		3675

Asp 1180	Leu	Gly	Arg	Val	Met	Val 1185	Met	Val	Gly	Ala	Thr 1190	Met	Thr	Asp	
gac Asp 1195	ata Ile	ggc Gly	atg Met	ggc Gly	gtg Val	act Thr 1200	tat Tyr	ctt Leu	gcc Ala	cta Leu	cta Leu 1205	gca Ala	gcc Ala	ttc Phe	3720
aaa Lys 1210	gtc Val	aga Arg	cca Pro	act Thr	ttt Phe	gca Ala 1215	gct Ala	gga Gly	cta Leu	ctc Leu	ttg Leu 1220	aga Arg	aag Lys	ctg Leu	3765
acc Thr 1225	tcc Ser	aag Lys	gaa Glu	ttg Leu	atg Met 1230	act Thr	act Thr	ata Ile	gga Gly	att Ile 1235	gta Val	ctc Leu	ctc Leu		3810
tcc Ser 1240	cag Gln	agc Ser	acc Thr	ata Ile	cca Pro	gag Glu 1245	acc Thr	att Ile	ctt Leu	gag Glu	ttg Leu 1250	act Thr	gat Asp	gcg Ala	3855
tta Leu 1255	gcc Ala	tta Leu	ggc Gly	atg Met	atg Met	gtc Val 1260	ctc Leu	aaa Lys	atg Met	gtg Val	aga Arg 1265	aat Asn	atg Met	gaa Glu	3900
aag Lys 1270	tat Tyr	caa Gln	ttg Leu	gca Ala	gtg Val	act Thr 1275	atc Ile	atg Met	gct Ala	atc Ile	ttg Leu 1280	tgc Cys	gtc Val	cca Pro	3945
aac Asn 1285	gca Ala	gtg Val	ata Ile	tta Leu	caa Gln	aac Asn 1290	gca Ala	tgg Trp	aaa Lys	gtg Val	agt Ser 1295	tgc Cys	aca Thr	ata Ile	3990
ttg Leu 1300	gca Ala	gtg Val	gtg Val	tcc Ser	gtt Val	tcc Ser 1305	cca Pro	ctg Leu	ttc Phe	tta Leu	aca Thr 1310	tcc Ser	tca Ser	cag Gln	4035
caa Gln 1315	aaa Lys	aca Thr	gat Asp	tgg Trp	ata Ile	cca Pro 1320	tta Leu	gca Ala	ttg Leu	acg Thr	atc Ile 1325	aaa Lys	ggc Gly	ctc Leu	4080
aat Asn 1330	cca Pro	aca Thr	gct Ala	att Ile	ttt Phe	cta Leu 1335	aca Thr	acc Thr	ctc Leu	tca Ser	aga Arg 1340	acc Thr	agc Ser	aag Lys	4125
aaa Lys 1345	agg Arg	agc Ser	tgg Trp	cca Pro	tta Leu	aat Asn 1350	gag Glu	gct Ala	atc Ile	atg Met	gca Ala 1355	gtc Val	ggg Gly	atg Met	4170
gtg Val 1360	agc Ser	att Ile	tta Leu	gcc Ala	agt Ser	tct Ser 1365	ctc Leu	cta Leu	aaa Lys	aat Asn	gat Asp 1370	att Ile	ccc Pro	atg Met	4215
aca Thr 1375	gga Gly	cca Pro	tta Leu	gtg Val	gct Ala	gga Gly 1380	ggg Gly	ctc Leu	ctc Leu	act Thr	gtg Val 1385	tgc Cys	tac Tyr	gtg Val	4260
ctc Leu 1390	act Thr	gga Gly	cga Arg	tcg Ser	gcc Ala	gat Asp 1395	ttg Leu	gaa Glu	ctg Leu	gag Glu	aga Arg 1400	gca Ala	gcc Ala	gat Asp	4305
gtc Val 1405	aaa Lys	tgg Trp	gaa Glu	gac Asp	cag Gln	gca Ala 1410	gag Glu	ata Ile	tca Ser	gga Gly	agc Ser 1415	agt Ser	cca Pro	atc Ile	4350
ctg Leu 1420	tca Ser	ata Ile	aca Thr	ata Ile	tca Ser	gaa Glu 1425	gat Asp	ggc Gly	agc Ser	atg Met	tcg Ser 1430	ata Ile	aaa Lys	aat Asn	4395
gaa 1440	gag	gaa	gaa	caa	aca	ctg	acc	ata	ctc	att	aga	aca	gga	ttg	4440

Glu	Glu	Glu	Glu	Gln	Thr	Leu	Thr	Ile	Leu	Ile	Arg	Thr	Gly	Leu	
1435	1440										1445				
ctg	gtg	atc	tca	gga	ctt	ttt	cct	gta	tca	ata	cca	atc	acg	gca	4485
Leu	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Phe	Pro	Val	Ser	Ile	Pro	Ile	Thr	Ala	
1450	1455					1460									
gca	gca	tgg	tac	ctg	tgg	gaa	gtg	aag	aaa	caa	cgg	gcc	gga	gta	4530
Ala	Ala	Trp	Tyr	Leu	Trp	Glu	Val	Lys	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Val	
1465	1470					1475									
ttg	tgg	gat	gtt	cct	tca	ccc	cca	ccc	atg	gga	aag	gct	gaa	ctg	4575
Leu	Trp	Asp	Val	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Met	Gly	Lys	Ala	Glu	Leu	
1480	1485					1490									
gaa	gat	gga	gcc	tat	aga	att	aag	caa	aaa	ggg	att	ctt	gga	tat	4620
Glu	Asp	Gly	Ala	Tyr	Arg	Ile	Lys	Gln	Lys	Gly	Ile	Leu	Gly	Tyr	
1495	1500					1505									
tcc	cag	atc	gga	gcc	gga	gtt	tac	aaa	gaa	gga	aca	ttc	cat	aca	4665
Ser	Gln	Ile	Gly	Ala	Gly	Val	Tyr	Lys	Glu	Gly	Thr	Phe	His	Thr	
1510	1515					1520									
atg	tgg	cat	gtc	aca	cgt	ggc	gct	gtt	cta	atg	cat	aaa	gga	aag	4710
Met	Trp	His	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Val	Leu	Met	His	Lys	Gly	Lys	
1525	1530					1535									
agg	att	gaa	cca	aca	tgg	gcg	gac	gtc	aag	aaa	gac	cta	ata	tca	4755
Arg	Ile	Glu	Pro	Thr	Trp	Ala	Asp	Val	Lys	Lys	Asp	Leu	Ile	Ser	
1540	1545					1550									
tat	gga	gga	ggc	tgg	aag	tta	gaa	gga	gaa	tgg	aag	gaa	gga	gaa	4800
Tyr	Gly	Gly	Gly	Trp	Lys	Leu	Glu	Gly	Glu	Trp	Lys	Glu	Gly	Glu	
1555	1560					1565									
gaa	gtc	cag	gta	ttg	gca	ctg	gag	cct	gga	aaa	aat	cca	aga	gcc	4845
Glu	Val	Gln	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	Pro	Gly	Lys	Asn	Pro	Arg	Ala	
1570	1575					1580									
gtc	caa	acg	aaa	cct	ggt	ctt	ttc	aaa	acc	aac	gcc	gga	aca	ata	4890
Val	Gln	Thr	Lys	Pro	Gly	Leu	Phe	Lys	Thr	Asn	Ala	Gly	Thr	Ile	
1585	1590					1595									
ggt	gct	gta	tct	ctg	gac	ttt	tct	cct	gga	acg	tca	gga	tct	cca	4935
Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Asp	Phe	Ser	Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Pro	
1600	1605					1610									
att	atc	gac	aaa	aaa	gga	aaa	gtt	gtg	ggt	ctt	tat	ggt	aat	ggt	4980
Ile	Ile	Asp	Lys	Lys	Gly	Lys	Val	Val	Gly	Leu	Tyr	Gly	Asn	Gly	
1615	1620					1625									
gtt	gtt	aca	agg	agt	gga	gca	tat	gtg	agt	gct	ata	gcc	cag	act	5025
Val	Val	Thr	Arg	Ser	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ala	Ile	Ala	Gln	Thr	
1630	1635					1640									
gaa	aaa	agc	att	gaa	gac	aac	cca	gag	atc	gaa	gat	cac	att	ttc	5070
Glu	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Asn	Pro	Glu	Ile	Glu	Asp	His	Ile	Phe	
1645	1650					1655									
cga	aag	aga	aga	ctg	acc	atc	atg	gac	ctc	cac	cca	gga	gcg	gga	5115
Arg	Lys	Arg	Arg	Leu	Thr	Ile	Met	Asp	Leu	His	Pro	Gly	Ala	Gly	
1660	1665					1670									
aag	acg	aag	aga	tac	ctt	ccg	gcc	ata	gtc	aga	gaa	gct	ata	aaa	5160
Lys	Thr	Lys	Arg	Tyr	Leu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Lys	
1675	1680					1685									
cgg	ggt	ttg	aga	aca	tta	atc	ttg	gcc	ccc	act	aga	gtt	gtg	gca	5205

Arg	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Ile	Leu	Ala	Pro	Thr	Arg	Val	Val	Ala	
1690						1695					1700				
gct	gaa	atg	gag	gaa	gcc	ctt	aga	gga	ctt	cca	ata	aga	tac	cag	5250
Ala	Glu	Met	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Pro	Ile	Arg	Tyr	Gln	
1705						1710					1715				
acc	cca	gcc	atc	aga	gct	gag	cac	acc	ggg	cgg	gag	att	gtg	gac	5295
Thr	Pro	Ala	Ile	Arg	Ala	Glu	His	Thr	Gly	Arg	Glu	Ile	Val	Asp	
1720						1725					1730				
cta	atg	tgt	cat	gcc	aca	ttt	acc	atg	agg	ctg	cta	tca	cca	gtt	5340
Leu	Met	Cys	His	Ala	Thr	Phe	Thr	Met	Arg	Leu	Leu	Ser	Pro	Val	
1735						1740					1745				
aga	gtg	cca	aac	tac	aac	ctg	att	atc	atg	gac	gaa	gcc	cat	ttc	5385
Arg	Val	Pro	Asn	Tyr	Asn	Leu	Ile	Ile	Met	Asp	Glu	Ala	His	Phe	
1750						1755					1760				
aca	gac	cca	gca	agt	ata	gca	gct	aga	gga	tac	atc	tca	act	cga	5430
Thr	Asp	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ile	Ser	Thr	Arg	
1765						1770					1775				
gtg	gag	atg	ggt	gag	gca	gct	ggg	att	ttt	atg	aca	gcc	act	ccc	5475
Val	Glu	Met	Gly	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Phe	Met	Thr	Ala	Thr	Pro	
1780						1785					1790				
ccg	gga	agc	aga	gac	cca	ttt	cct	cag	agc	aat	gca	cca	atc	ata	5520
Pro	Gly	Ser	Arg	Asp	Pro	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	Ala	Pro	Ile	Ile	
1795						1800					1805				
gat	gaa	gaa	aga	gaa	atc	cct	gaa	cgc	tcg	tgg	aat	tcc	gga	cat	5565
Asp	Glu	Glu	Arg	Glu	Ile	Pro	Glu	Arg	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	His	
1810						1815					1820				
gaa	tgg	gtc	acg	gat	ttt	aaa	ggg	aag	act	gtt	tgg	ttc	gtt	cca	5610
Glu	Trp	Val	Thr	Asp	Phe	Lys	Gly	Lys	Thr	Val	Trp	Phe	Val	Pro	
1825						1830					1835				
agt	ata	aaa	gca	gga	aat	gat	ata	gca	gct	tgc	ctg	agg	aaa	aat	5655
Ser	Ile	Lys	Ala	Gly	Asn	Asp	Ile	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg	Lys	Asn	
1840						1845					1850				
gga	aag	aaa	gtg	ata	caa	ctc	agt	agg	aag	acc	ttt	gat	tct	gag	5700
Gly	Lys	Lys	Val	Ile	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Thr	Phe	Asp	Ser	Glu	
1855						1860					1865				
tat	gtc	aag	act	aga	acc	aat	gat	tgg	gac	ttc	gtg	gtt	aca	act	5745
Tyr	Val	Lys	Thr	Arg	Thr	Asn	Asp	Trp	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Thr	
1870						1875					1880				
gac	att	tca	gaa	atg	ggt	gcc	aat	ttc	aag	gct	gag	agg	gtt	ata	5790
Asp	Ile	Ser	Glu	Met	Gly	Ala	Asn	Phe	Lys	Ala	Glu	Arg	Val	Ile	
1885						1890					1895				
gac	ccc	aga	cgc	tgc	atg	aaa	cca	gtc	ata	cta	aca	gat	ggt	gaa	5835
Asp	Pro	Arg	Arg	Cys	Met	Lys	Pro	Val	Ile	Leu	Thr	Asp	Gly	Glu	
1900						1905					1910				
gag	cgg	gtg	att	ctg	gca	gga	cct	atg	cca	gtg	acc	cac	tct	agt	5880
Glu	Arg	Val	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Met	Pro	Val	Thr	His	Ser	Ser	
1915						1920					1925				
gca	gca	caa	aga	aga	ggg	aga	ata	gga	aga	aat	cca	aaa	aat	gag	5925
Ala	Ala	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Gly	Arg	Asn	Pro	Lys	Asn	Glu	
1930						1935					1940				
aat	gac	cag	tac	ata	tac	atg	ggg	gaa	cct	ctg	gaa	aat	gat	gaa	5970

Asn 1945	Asp	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Met 1950	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu 1955	Asn	Asp	Glu	
gac Asp	tgt Cys 1960	gca Ala	cac His	tgg Trp	aaa Lys	gaa Glu 1965	gct Ala	aaa Lys	atg Met	ctc Leu	cta Leu 1970	gat Asp	aac Asn	atc Ile	6015
aac Asn	acg Thr 1975	cca Pro	gaa Glu	gga Gly	atc Ile	att Ile 1980	cct Pro	agc Ser	atg Met	ttc Phe	gaa Glu 1985	cca Pro	gag Glu	cgt Arg	6060
gaa Glu	aag Lys 1990	gtg Val	gat Asp	gcc Ala	att Ile	gat Asp 1995	ggc Gly	gaa Glu	tac Tyr	cgc Arg	ttg Leu 2000	aga Arg	gga Gly	gaa Glu	6105
gca Ala	agg Arg 2005	aaa Lys	acc Thr	ttt Phe	gta Val	gac Asp 2010	tta Leu	atg Met	aga Arg	aga Arg	gga Gly 2015	gac Asp	cta Leu	cca Pro	6150
gtc Val	tgg Trp 2020	ttg Leu	gcc Ala	tac Tyr	aga Arg	gtg Val 2025	gca Ala	gct Ala	gaa Glu	ggc Gly	atc Ile 2030	aac Asn	tac Tyr	gca Ala	6195
gac Asp	aga Arg 2035	agg Arg	tgg Trp	tgt Cys	ttt Phe	gat Asp 2040	gga Gly	gtc Val	aag Lys	aac Asn	aac Asn 2045	caa Gln	atc Ile	cta Leu	6240
gaa Glu	gaa Glu 2050	aac Asn	gtg Val	gaa Glu	gtt Val	gaa Glu 2055	atc Ile	tgg Trp	aca Thr	aaa Lys	gaa Glu 2060	ggg Gly	gaa Glu	agg Arg	6285
aag Lys	aaa Lys 2065	ttg Leu	aaa Lys	ccc Pro	aga Arg	tgg Trp 2070	ttg Leu	gat Asp	gct Ala	agg Arg	atc Ile 2075	tat Tyr	tct Ser	gac Asp	6330
cca Pro	ctg Leu 2080	gcg Ala	cta Leu	aaa Lys	gaa Glu	ttt Phe 2085	aag Lys	gaa Glu	ttt Phe	gca Ala	gcc Ala 2090	gga Gly	aga Arg	aag Lys	6375
tct Ser	ctg Leu 2095	acc Thr	ctg Leu	aac Asn	cta Leu	atc Ile 2100	aca Thr	gaa Glu	atg Met	ggc Gly	agg Arg 2105	ctc Leu	cca Pro	acc Thr	6420
ttc Phe	atg Met 2110	act Thr	cag Gln	aag Lys	gca Ala	aga Arg 2115	gac Asp	gca Ala	ctg Leu	gac Asp	aac Asn 2120	tta Leu	gca Ala	gtg Val	6465
ctg Leu	cac His 2125	acg Thr	gct Ala	gag Glu	gca Ala	ggc Gly 2130	gga Gly	agg Arg	gcg Ala	tac Tyr	aac Asn 2135	cat His	gct Ala	ctc Leu	6510
agt Ser	gaa Glu 2140	ctg Leu	ccg Pro	gag Glu	acc Thr	ctg Leu 2145	gag Glu	aca Thr	ttg Leu	ctt Leu	tta Leu 2150	ctg Leu	aca Thr	ctt Leu	6555
ctg Leu	gct Ala 2155	aca Thr	gtc Val	acg Thr	gga Gly	ggg Gly 2160	atc Ile	ttt Phe	tta Leu	ttc Phe	ttg Leu 2165	atg Met	agc Ser	gca Ala	6600
agg Arg	ggc Gly 2170	ata Ile	ggg Gly	aag Lys	atg Met	acc Thr 2175	ctg Leu	gga Gly	atg Met	tgc Cys	tgc Cys 2180	ata Ile	atc Ile	acg Thr	6645
gct Ala	agc Ser 2185	atc Ile	ctc Leu	cta Leu	tgg Trp	tac Tyr 2190	gca Ala	caa Gln	ata Ile	cag Gln	cca Pro 2195	cac His	tgg Trp	ata Ile	6690
gca gct	tca	ata	ata	ctg	gag	ttt	ttt	ctc	ata	gtt	ttg	ctt	att		6735

Ala	Ala	Ser	Ile	Ile	Leu	Glu	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ile	
	2200					2205					2210				
cca	gaa	cct	gaa	aaa	cag	aga	aca	ccc	caa	gac	aac	caa	ctg	acc	6780
Pro	Glu	Pro	Glu	Lys	Gln	Arg	Thr	Pro	Gln	Asp	Asn	Gln	Leu	Thr	
	2215					2220					2225				
tac	gtt	gtc	ata	gcc	atc	ctc	aca	gtg	gtg	gcc	gca	acc	atg	gca	6825
Tyr	Val	Val	Ile	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Met	Ala	
	2230					2235					2240				
aac	gag	atg	ggt	ttc	cta	gaa	aaa	acg	aag	aaa	gat	ctc	gga	ttg	6870
Asn	Glu	Met	Gly	Phe	Leu	Glu	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	
	2245					2250					2255				
gga	agc	att	gca	acc	cag	caa	ccc	gag	agc	aac	atc	ctg	gac	ata	6915
Gly	Ser	Ile	Ala	Thr	Gln	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Ile	Leu	Asp	Ile	
	2260					2265					2270				
gat	cta	cgt	cct	gca	tca	gca	tgg	acg	ctg	tat	gcc	gtg	gcc	aca	6960
Asp	Leu	Arg	Pro	Ala	Ser	Ala	Trp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala	Thr	
	2275					2280					2285				
aca	ttt	gtt	aca	cca	atg	ttg	aga	cat	agc	att	gaa	aat	tcc	tca	7005
Thr	Phe	Val	Thr	Pro	Met	Leu	Arg	His	Ser	Ile	Glu	Asn	Ser	Ser	
	2290					2295					2300				
gtg	aat	gtg	tcc	cta	aca	gct	ata	gcc	aac	caa	gcc	aca	gtg	tta	7050
Val	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Asn	Gln	Ala	Thr	Val	Leu	
	2305					2310					2315				
atg	ggt	ctc	ggg	aaa	gga	tgg	cca	ttg	tca	aag	atg	gac	atc	gga	7095
Met	Gly	Leu	Gly	Lys	Gly	Trp	Pro	Leu	Ser	Lys	Met	Asp	Ile	Gly	
	2320					2325					2330				
gtt	ccc	ctt	ctc	gcc	att	gga	tgc	tac	tca	caa	gtc	aac	ccc	ata	7140
Val	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile	Gly	Cys	Tyr	Ser	Gln	Val	Asn	Pro	Ile	
	2335					2340					2345				
act	ctc	aca	gca	gct	ctt	ttc	tta	ttg	gta	gca	cat	tat	gcc	atc	7185
Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	Val	Ala	His	Tyr	Ala	Ile	
	2350					2355					2360				
ata	ggg	cca	gga	ctc	caa	gca	aaa	gca	acc	aga	gaa	gct	cag	aaa	7230
Ile	Gly	Pro	Gly	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Thr	Arg	Glu	Ala	Gln	Lys	
	2365					2370					2375				
aga	gca	gcg	gcg	ggc	atc	atg	aaa	aac	cca	act	gtc	gat	gga	ata	7275
Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Met	Lys	Asn	Pro	Thr	Val	Asp	Gly	Ile	
	2380					2385					2390				
aca	gtg	att	gac	cta	gat	cca	ata	cct	tat	gat	cca	aag	ttt	gaa	7320
Thr	Val	Ile	Asp	Leu	Asp	Pro	Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	Glu	
	2395					2400					2405				
aag	cag	ttg	gga	caa	gta	atg	ctc	cta	gtc	ctc	tgc	gtg	act	caa	7365
Lys	Gln	Leu	Gly	Gln	Val	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Val	Thr	Gln	
	2410					2415					2420				
gta	ttg	atg	atg	agg	act	aca	tgg	gct	ctg	tgt	gag	gct	tta	acc	7410
Val	Leu	Met	Met	Arg	Thr	Thr	Trp	Ala	Leu	Cys	Glu	Ala	Leu	Thr	
	2425					2430					2435				
tta	gct	acc	ggg	ccc	atc	tcc	aca	ttg	tgg	gaa	gga	aat	cca	ggg	7455
Leu	Ala	Thr	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Leu	Trp	Glu	Gly	Asn	Pro	Gly	
	2440					2445					2450				
agg	ttt	tgg	aac	act	acc	att	gcg	gtg	tca	atg	gct	aac	att	ttt	7500

Arg	Phe 2455	Trp	Asn	Thr	Thr	Ile 2460	Ala	Val	Ser	Met	Ala 2465	Asn	Ile	Phe	
aga Arg	ggg Gly 2470	agt Ser	tac Tyr	ttg Leu	gcc Ala	gga Gly 2475	gct Ala	gga Gly	ctt Leu	ctc Leu	ttt Phe 2480	tct Ser	att Ile	atg Met	7545
aag Lys	aac Asn 2485	aca Thr	acc Thr	aac Asn	aca Thr	aga Arg 2490	agg Arg	gga Gly	act Thr	ggc Gly	aac Asn 2495	ata Ile	gga Gly	gag Glu	7590
acg Thr	ctt Leu 2500	gga Gly	gag Glu	aaa Lys	tgg Trp	aaa Lys 2505	agc Ser	cga Arg	ttg Leu	aac Asn	gca Ala 2510	ttg Leu	gga Gly	aaa Lys	7635
agt Ser	gaa Glu 2515	ttc Phe	cag Gln	atc Ile	tac Tyr	aag Lys 2520	aaa Lys	agt Ser	gga Gly	atc Ile	cag Gln 2525	gaa Glu	gtg Val	gat Asp	7680
aga Arg	acc Thr 2530	tta Leu	gca Ala	aaa Lys	gaa Glu	ggc Gly 2535	att Ile	aaa Lys	aga Arg	gga Gly	gaa Glu 2540	acg Thr	gac Asp	cat His	7725
cac His	gct Ala 2545	gtg Val	tcg Ser	cga Arg	ggc Gly	tca Ser 2550	gca Ala	aaa Lys	ctg Leu	aga Arg	tgg Trp 2555	ttc Phe	gtt Val	gag Glu	7770
aga Arg	aac Asn 2560	atg Met	gtc Val	aca Thr	cca Pro	gaa Glu 2565	ggg Gly	aaa Lys	gta Val	gtg Val	gac Asp 2570	ctc Leu	ggt Gly	tgt Cys	7815
ggc Gly	aga Arg 2575	gga Gly	ggc Gly	tgg Trp	tca Ser	tac Tyr 2580	tat Tyr	tgt Cys	gga Gly	gga Gly	cta Leu 2585	aag Lys	aat Asn	gta Val	7860
aga Arg	gaa Glu 2590	gtc Val	aaa Lys	ggc Gly	cta Leu	aca Thr 2595	aaa Lys	gga Gly	gga Gly	cca Pro	gga Gly 2600	cac His	gaa Glu	gaa Glu	7905
ccc Pro	atc Ile 2605	ccc Pro	atg Met	tca Ser	aca Thr	tat Tyr 2610	ggg Gly	tgg Trp	aat Asn	cta Leu	gtg Val 2615	cgt Arg	ctt Leu	caa Gln	7950
agt Ser	gga Gly 2620	gtt Val	gac Asp	gtt Val	ttc Phe	ttc Phe 2625	atc Ile	ccg Pro	cca Pro	gaa Glu	aag Lys 2630	tgt Cys	gac Asp	aca Thr	7995
tta Leu	ttg Leu 2635	tgt Cys	gac Asp	ata Ile	ggg Gly	gag Glu 2640	tca Ser	tca Ser	cca Pro	aat Asn	ccc Pro 2645	aca Thr	gtg Val	gaa Glu	8040
gca Ala	gga Gly 2650	cga Arg	aca Thr	ctc Leu	aga Arg	gtc Val 2655	ctt Leu	aac Asn	tta Leu	gta Val	gaa Glu 2660	aat Asn	tgg Trp	ttg Leu	8085
aac Asn	aac Asn 2665	aac Asn	act Thr	caa Gln	ttt Phe	tgc Cys 2670	ata Ile	aag Lys	gtt Val	ctc Leu	aac Asn 2675	cca Pro	tat Tyr	atg Met	8130
ccc Pro	tca Ser 2680	gtc Val	ata Ile	gaa Glu	aaa Lys	atg Met 2685	gaa Glu	gca Ala	cta Leu	caa Gln	agg Arg 2690	aaa Lys	tat Tyr	gga Gly	8175
gga Gly	gcc Ala 2695	tta Leu	gtg Val	agg Arg	aat Asn	cca Pro 2700	ctc Leu	tca Ser	cga Arg	aac Asn	tcc Ser 2705	aca Thr	cat His	gag Glu	8220
atg	tac	tgg	gta	tcc	aat	gct	tcc	ggg	aac	ata	gtg	tca	tca	gtg	8265

Met	Tyr	Trp	Val	Ser	Asn	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	Val	Ser	Ser	Val	
2710						2715					2720				
aac	atg	att	tca	agg	atg	ttg	atc	aac	aga	ttt	aca	atg	aga	tac	8310
Asn	Met	Ile	Ser	Arg	Met	Leu	Ile	Asn	Arg	Phe	Thr	Met	Arg	Tyr	
2725						2730					2735				
aag	aaa	gcc	act	tac	gag	ccg	gat	gtt	gac	ctc	gga	agc	gga	acc	8355
Lys	Lys	Ala	Thr	Tyr	Glu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	
2740						2745					2750				
cgt	aac	atc	ggg	att	gaa	agt	gag	ata	cca	aac	cta	gat	ata	att	8400
Arg	Asn	Ile	Gly	Ile	Glu	Ser	Glu	Ile	Pro	Asn	Leu	Asp	Ile	Ile	
2755						2760					2765				
ggg	aaa	aga	ata	gaa	aaa	ata	aag	caa	gag	cat	gaa	aca	tca	tgg	8445
Gly	Lys	Arg	Ile	Glu	Lys	Ile	Lys	Gln	Glu	His	Glu	Thr	Ser	Trp	
2770						2775					2780				
cac	tat	gac	caa	gac	cac	cca	tac	aaa	acg	tgg	gca	tac	cat	ggt	8490
His	Tyr	Asp	Gln	Asp	His	Pro	Tyr	Lys	Thr	Trp	Ala	Tyr	His	Gly	
2785						2790					2795				
agc	tat	gaa	aca	aaa	cag	act	gga	tca	gca	tca	tcc	atg	gtc	aac	8535
Ser	Tyr	Glu	Thr	Lys	Gln	Thr	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Met	Val	Asn	
2800						2805					2810				
gga	gtg	gtc	agg	ctg	ctg	aca	aaa	cct	tgg	gac	gtt	gtc	ccc	atg	8580
Gly	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Thr	Lys	Pro	Trp	Asp	Val	Val	Pro	Met	
2815						2820					2825				
gtg	aca	cag	atg	gca	atg	aca	gac	acg	act	cca	ttt	gga	caa	cag	8625
Val	Thr	Gln	Met	Ala	Met	Thr	Asp	Thr	Thr	Pro	Phe	Gly	Gln	Gln	
2830						2835					2840				
cgc	gtt	ttt	aaa	gag	aaa	gtg	gac	acg	aga	acc	caa	gaa	ccg	aaa	8670
Arg	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg	Thr	Gln	Glu	Pro	Lys	
2845						2850					2855				
gaa	ggc	acg	aag	aaa	cta	atg	aaa	ata	aca	gca	gag	tgg	ctt	tgg	8715
Glu	Gly	Thr	Lys	Lys	Leu	Met	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Trp	Leu	Trp	
2860						2865					2870				
aaa	gaa	tta	ggg	aag	aaa	aag	aca	ccc	agg	atg	tgc	acc	aga	gaa	8760
Lys	Glu	Leu	Gly	Lys	Lys	Lys	Thr	Pro	Arg	Met	Cys	Thr	Arg	Glu	
2875						2880					2885				
gaa	ttc	aca	aga	aag	gtg	aga	agc	aat	gca	gcc	ttg	ggg	gcc	ata	8805
Glu	Phe	Thr	Arg	Lys	Val	Arg	Ser	Asn	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Ile	
2890						2895					2900				
ttc	act	gat	gag	aac	aag	tgg	aag	tcg	gca	cgt	gag	gct	gtt	gaa	8850
Phe	Thr	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Lys	Ser	Ala	Arg	Glu	Ala	Val	Glu	
2905						2910					2915				
gat	agt	agg	ttt	tgg	gag	ctg	gtt	gac	aag	gaa	agg	aat	ctc	cat	8895
Asp	Ser	Arg	Phe	Trp	Glu	Leu	Val	Asp	Lys	Glu	Arg	Asn	Leu	His	
2920						2925					2930				
ctt	gaa	gga	aag	tgt	gaa	aca	tgt	gtg	tac	aac	atg	atg	gga	aaa	8940
Leu	Glu	Gly	Lys	Cys	Glu	Thr	Cys	Val	Tyr	Asn	Met	Met	Gly	Lys	
2935						2940					2945				
aga	gag	aag	aag	cta	ggg	gaa	ttc	ggc	aag	gca	aaa	ggc	agc	aga	8985
Arg	Glu	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Phe	Gly	Lys	Ala	Lys	Gly	Ser	Arg	
2950						2955					2960				
gcc	ata	tgg	tac	atg	tgg	ctt	gga	gca	cgc	ttc	tta	gag	ttt	gaa	9030

Ala	Ile	Trp	Tyr	Met	Trp	Leu	Gly	Ala	Arg	Phe	Leu	Glu	Phe	Glu	
	2965					2970					2975				
gcc	cta	gga	ttc	tta	aat	gaa	gat	cac	tgg	ttc	tcc	aga	gag	aac	9075
Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Asn	Glu	Asp	His	Trp	Phe	Ser	Arg	Glu	Asn	
	2980					2985					2990				
tcc	ctg	agt	gga	gtg	gaa	gga	gaa	ggg	ctg	cac	aag	cta	ggt	tac	9120
Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Glu	Gly	Glu	Gly	Leu	His	Lys	Leu	Gly	Tyr	
	2995					3000					3005				
att	cta	aga	gac	gtg	agc	aag	aaa	gag	gga	gga	gca	atg	tat	gcc	9165
Ile	Leu	Arg	Asp	Val	Ser	Lys	Lys	Glu	Gly	Gly	Ala	Met	Tyr	Ala	
	3010					3015					3020				
gat	gac	acc	gca	gga	tgg	gat	aca	aaa	atc	aca	cta	gaa	gac	cta	9210
Asp	Asp	Thr	Ala	Gly	Trp	Asp	Thr	Lys	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	
	3025					3030					3035				
aaa	aat	gaa	gag	atg	gta	aca	aac	cac	atg	gaa	gga	gaa	cac	aag	9255
Lys	Asn	Glu	Glu	Met	Val	Thr	Asn	His	Met	Glu	Gly	Glu	His	Lys	
	3040					3045					3050				
aaa	cta	gcc	gag	gcc	att	ttc	aaa	cta	acg	tac	caa	aac	aag	gtg	9300
Lys	Leu	Ala	Glu	Ala	Ile	Phe	Lys	Leu	Thr	Tyr	Gln	Asn	Lys	Val	
	3055					3060					3065				
gtg	cgt	gtg	caa	aga	cca	aca	cca	aga	ggc	aca	gta	atg	gac	atc	9345
Val	Arg	Val	Gln	Arg	Pro	Thr	Pro	Arg	Gly	Thr	Val	Met	Asp	Ile	
	3070					3075					3080				
ata	tcg	aga	aga	gac	caa	aga	ggt	agt	gga	caa	gtt	ggc	acc	tat	9390
Ile	Ser	Arg	Arg	Asp	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gln	Val	Gly	Thr	Tyr	
	3085					3090					3095				
gga	ctc	aat	act	ttc	acc	aat	atg	gaa	gcc	caa	cta	atc	aga	cag	9435
Gly	Leu	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Met	Glu	Ala	Gln	Leu	Ile	Arg	Gln	
	3100					3105					3110				
atg	gag	gga	gaa	gga	gtc	ttt	aaa	agc	att	cag	cac	cta	aca	atc	9480
Met	Glu	Gly	Glu	Gly	Val	Phe	Lys	Ser	Ile	Gln	His	Leu	Thr	Ile	
	3115					3120					3125				
aca	gaa	gaa	atc	gct	gtg	caa	aac	tgg	tta	gca	aga	gtg	ggg	cgc	9525
Thr	Glu	Glu	Ile	Ala	Val	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Arg	
	3130					3135					3140				
gaa	agg	tta	tca	aga	atg	gcc	atc	agt	gga	gat	gat	tgt	gtt	gtg	9570
Glu	Arg	Leu	Ser	Arg	Met	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Asp	Cys	Val	Val	
	3145					3150					3155				
aaa	cct	tta	gat	gac	agg	ttc	gca	agc	gct	tta	aca	gct	cta	aat	9615
Lys	Pro	Leu	Asp	Asp	Arg	Phe	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Leu	Asn	
	3160					3165					3170				
gac	atg	gga	aag	att	agg	aaa	gac	ata	caa	caa	tgg	gaa	cct	tca	9660
Asp	Met	Gly	Lys	Ile	Arg	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Trp	Glu	Pro	Ser	
	3175					3180					3185				
aga	gga	tgg	aat	gat	tgg	aca	caa	gtg	ccc	ttc	tgt	tca	cac	cat	9705
Arg	Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Thr	Gln	Val	Pro	Phe	Cys	Ser	His	His	
	3190					3195					3200				
ttc	cat	gag	tta	atc	atg	aaa	gac	ggt	cgc	gta	ctc	gtt	gtt	cca	9750
Phe	His	Glu	Leu	Ile	Met	Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Leu	Val	Val	Pro	
	3205					3210					3215				
tgt	aga	aac	caa	gat	gaa	ctg	att	ggc	aga	gcc	cga	atc	tcc	caa	9795

Cys Arg 3220	Asn Gln Asp Glu Leu 3225	Ile Gly Arg Ala Arg 3230	Ile Ser Gln	
gga Gly 3235	gca Ala 3235	ggg Gly 3240	tgg Trp 3240	tct Ser 3240
tac Tyr 3250	gcc Ala 3250	caa Gln 3255	atg Met 3255	tgg Trp 3255
agg Arg 3265	ctg Leu 3265	gcg Ala 3270	gca Ala 3270	aat Asn 3270
gtt Val 3280	cca Pro 3280	aca Thr 3285	agt Ser 3285	cga Arg 3285
tgg Trp 3295	atg Met 3295	aca Thr 3300	acg Thr 3300	gaa Glu 3300
att Ile 3310	caa Gln 3310	gaa Glu 3315	aac Asn 3315	cca Pro 3315
tgg Trp 3325	gag Glu 3325	gaa Glu 3330	atc Ile 3330	cca Pro 3330
ggc Gly 3340	tca Ser 3340	ttg Leu 3345	att Ile 3345	ggg Gly 3345
atc Ile 3355	caa Gln 3355	gca Ala 3360	gca Ala 3360	ata Ile 3360
gaa Glu 3370	tac Tyr 3370	aca Thr 3375	gat Asp 3375	tac Tyr 3375
gag Glu 3385	gaa Glu 3385	gaa Glu 3390	gca Ala 3390	gga Gly 3390
caaggctaga	agtcaggctcg	gattaagcca	tagtacggaa	aaaactatgc
ccccgtccaa	ggacgttaaa	agaagtcagg	ccatcataaa	tgccatagct
atgcagcctg	tagctccacc	tgagaagggtg	taaaaaatcc	gggaggccac
agctgtacgc	atggcgtagt	ggactagcgg	ttagggggaga	cccctccctt
gcaacaatgg	gggccaagg	cgagatgaag	ctgtagtctc	gctggaagga
gaggagaccc	ccccgaaaca	aaaaacagca	tattgacgct	gggaaagacc
ctgtctcctc	agcatcattc	caggcacaga	acgccagaaa	atggaatggt
caacaggttc	t			

```
<210> 2
<211> 3391
<212> PRT
<213> Vírus da Dengue
```

<400> 2

Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Phe Asn Met Leu
 1 5 10 15
 Lys Arg Glu Arg Asn Arg Val Ser Thr Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg
 20 25 30
 Phe Ser Leu Gly Met Leu Gln Gly Arg Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met
 35 40 45
 Ala Leu Val Ala Phe Leu Arg Phe Leu Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly
 50 55 60
 Ile Leu Lys Arg Trp Gly Thr Ile Lys Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn
 85 90 95
 Arg Arg Arg Arg Ser Ala Gly Met Ile Ile Met Leu Ile Pro Thr Val
 100 105 110
 Met Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val
 115 120 125
 Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Glu Val Gly
 130 135 140
 Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu
 145 150 155 160
 Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu
 165 170 175
 Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly
 180 185 190
 Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala
 195 200 205
 Leu Val Pro His Val Arg Met Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp
 210 215 220
 Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp
 225 230 235 240
 Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr
 245 250 255
 Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu

260										265					270						
Thr	Ala	Val	Thr	Pro	Ser	Met	Thr	Met	Arg	Cys	Ile	Gly	Met	Ser	Asn						
		275					280					285									
Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Gly	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Trp	Val	Asp	Ile	Val						
	290					295					300										
Leu	Glu	His	Gly	Ser	Cys	Val	Thr	Thr	Met	Ala	Lys	Asn	Lys	Pro	Thr						
305					310					315					320						
Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Ile	Lys	Thr	Glu	Ala	Lys	Gln	Pro	Ala	Thr	Leu						
				325					330					335							
Arg	Lys	Tyr	Cys	Ile	Glu	Ala	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser						
			340					345						350							
Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Asp	Lys						
		355					360					365									
Arg	Phe	Val	Cys	Lys	His	Ser	Met	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly						
	370					375					380										
Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Gly	Ile	Val	Thr	Cys	Ala	Met	Phe	Arg						
385					390					395					400						
Cys	Lys	Lys	Asn	Met	Glu	Gly	Lys	Val	Val	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Glu						
				405					410					415							
Tyr	Thr	Ile	Val	Ile	Thr	Pro	His	Ser	Gly	Glu	Glu	His	Ala	Val	Gly						
			420					425					430								
Asn	Asp	Thr	Gly	Lys	His	Gly	Lys	Glu	Ile	Lys	Ile	Thr	Pro	Gln	Ser						
		435					440					445									
Ser	Ile	Thr	Glu	Ala	Glu	Leu	Thr	Gly	Tyr	Gly	Thr	Val	Thr	Met	Glu						
	450					455					460										
Cys	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Asn	Glu	Met	Val	Leu	Leu	Gln						
465					470					475					480						
Met	Glu	Asn	Lys	Ala	Trp	Leu	Val	His	Arg	Gln	Trp	Phe	Leu	Asp	Leu						
				485					490					495							
Pro	Leu	Pro	Trp	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Thr	Gln	Glu	Ser	Asn	Trp	Ile						
			500					505					510								
Gln	Lys	Glu	Thr	Leu	Val	Thr	Phe	Lys	Asn	Pro	His	Ala	Lys	Lys	Gln						
		515					520					525									
Asp	Val	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Met	His	Thr	Ala	Leu						

530

535

540

Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr
 545 550 555 560

Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly
 565 570 575

Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile
 580 585 590

Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly
 595 600 605

Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys
 610 615 620

Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu
 625 630 635 640

Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser
 645 650 655

Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe
 660 665 670

Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly
 675 680 685

Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser
 690 695 700

Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe
 705 710 715 720

Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys
 725 730 735

Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Ser
 740 745 750

Thr Ser Leu Ser Val Thr Leu Val Leu Val Gly Ile Val Thr Leu Tyr
 755 760 765

Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys Val Val Ser Trp Lys
 770 775 780

Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Ile Thr Asp Asn Val
 785 790 795 800

His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro Glu Ser Pro Ser Lys

805										810					815				
Leu	Ala	Ser	Ala ₈₂₀	Ile	Gln	Lys	Ala	His ₈₂₅	Glu	Glu	Asp	Ile	Cys ₈₃₀	Gly	Ile				
Arg	Ser	Val ₈₃₅	Thr	Arg	Leu	Glu	Asn ₈₄₀	Leu	Met	Trp	Lys	Gln ₈₄₅	Ile	Thr	Pro				
Glu	Leu ₈₅₀	Asn	His	Ile	Leu	Ser ₈₅₅	Glu	Asn	Glu	Val	Lys ₈₆₀	Leu	Thr	Ile	Met				
Thr ₈₆₅	Gly	Asp	Ile	Lys	Gly ₈₇₀	Ile	Met	Gln	Ala	Gly ₈₇₅	Lys	Arg	Ser	Leu	Arg ₈₈₀				
Pro	Gln	Pro	Thr	Glu ₈₈₅	Leu	Lys	Tyr	Ser	Trp ₈₉₀	Lys	Thr	Trp	Gly	Lys ₈₉₅	Ala				
Lys	Met	Leu	Ser ₉₀₀	Thr	Glu	Ser	His	Asn ₉₀₅	Gln	Thr	Phe	Leu	Ile ₉₁₀	Asp	Gly				
Pro	Glu	Thr ₉₁₅	Ala	Glu	Cys	Pro	Asn ₉₂₀	Thr	Asn	Arg	Ala	Trp ₉₂₅	Asn	Ser	Leu				
Glu	Val ₉₃₀	Glu	Asp	Tyr	Gly	Phe ₉₃₅	Gly	Val	Phe	Thr	Thr ₉₄₀	Asn	Ile	Trp	Leu				
Lys ₉₄₅	Leu	Lys	Glu	Lys	Gln ₉₅₀	Asp	Val	Phe	Cys	Asp ₉₅₅	Ser	Lys	Leu	Met	Ser ₉₆₀				
Ala	Ala	Ile	Lys	Asp ₉₆₅	Asn	Arg	Ala	Val	His ₉₇₀	Ala	Asp	Met	Gly	Tyr ₉₇₅	Trp				
Ile	Glu	Ser	Ala ₉₈₀	Leu	Asn	Asp	Thr	Trp ₉₈₅	Lys	Ile	Glu	Lys	Ala ₉₉₀	Ser	Phe				
Ile	Glu	Val ₉₉₅	Lys	Asn	Cys	His	Trp ₁₀₀₀	Pro	Lys	Ser	His	Thr ₁₀₀₅	Leu	Trp	Ser				
Asn	Gly ₁₀₁₀	Val	Leu	Glu	Ser	Glu ₁₀₁₅	Met	Ile	Ile	Pro	Lys ₁₀₂₀	Asn	Leu	Ala					
Gly	Pro ₁₀₂₅	Val	Ser	Gln	His	Asn ₁₀₃₀	Tyr	Arg	Pro	Gly	Tyr ₁₀₃₅	His	Thr	Gln					
Ile	Thr ₁₀₄₀	Gly	Pro	Trp	His	Leu ₁₀₄₅	Gly	Lys	Leu	Glu	Met ₁₀₅₀	Asp	Phe	Asp					
Phe	Cys ₁₀₅₅	Asp	Gly	Thr	Thr	Val ₁₀₆₀	Val	Val	Thr	Glu	Asp ₁₀₆₅	Cys	Gly	Asn					
Arg	Gly	Pro	Ser	Leu	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile					

1070	1075	1080
Thr Glu 1085 Trp Cys Cys Arg	Ser 1090 Cys Thr Leu Pro	Pro 1095 Leu Arg Tyr
Arg Gly 1100 Glu Asp Gly Cys	Trp 1105 Tyr Gly Met Glu	Ile 1110 Arg Pro Leu
Lys Glu 1115 Lys Glu Glu Asn	Leu 1120 Val Asn Ser Leu	Val 1125 Thr Ala Gly
His Gly 1130 Gln Val Asp Asn	Phe 1135 Ser Leu Gly Val	Leu 1140 Gly Met Ala
Leu Phe 1145 Leu Glu Glu Met	Leu 1150 Arg Thr Arg Val	Gly 1155 Thr Lys His
Ala Ile 1160 Leu Leu Val Ala	Val 1165 Ser Phe Val Thr	Leu 1170 Ile Thr Gly
Asn Met 1175 Ser Phe Arg Asp	Leu 1180 Gly Arg Val Met	Val 1185 Met Val Gly
Ala Thr 1190 Met Thr Asp Asp	Ile 1195 Gly Met Gly Val	Thr 1200 Tyr Leu Ala
Leu Leu 1205 Ala Ala Phe Lys	Val 1210 Arg Pro Thr Phe	Ala 1215 Ala Gly Leu
Leu Leu 1220 Arg Lys Leu Thr	Ser 1225 Lys Glu Leu Met	Met 1230 Thr Thr Ile
Gly Ile 1235 Val Leu Leu Ser	Gln 1240 Ser Thr Ile Pro	Glu 1245 Thr Ile Leu
Glu Leu 1250 Thr Asp Ala Leu	Ala 1255 Leu Gly Met Met	Val 1260 Leu Lys Met
Val Arg 1265 Asn Met Glu Lys	Tyr 1270 Gln Leu Ala Val	Thr 1275 Ile Met Ala
Ile Leu 1280 Cys Val Pro Asn	Ala 1285 Val Ile Leu Gln	Asn 1290 Ala Trp Lys
Val Ser 1295 Cys Thr Ile Leu	Ala 1300 Val Val Ser Val	Ser 1305 Pro Leu Phe
Leu Thr 1310 Ser Ser Gln Gln	Lys 1315 Thr Asp Trp Ile	Pro 1320 Leu Ala Leu
Thr Ile Lys Gly Leu Asn Pro	Thr Ala Ile Phe Leu	Thr Thr Leu

1325		1330		1335
Ser Arg 1340	Thr Ser Lys Lys	Arg 1345	Ser Trp Pro Leu	Asn 1350
Met Ala 1355	Val Gly Met Val	Ser 1360	Ile Leu Ala Ser	Ser 1365
Asn Asp 1370	Ile Pro Met Thr	Gly 1375	Pro Leu Val Ala	Gly 1380
Thr Val 1385	Cys Tyr Val Leu	Thr 1390	Gly Arg Ser Ala	Asp 1395
Glu Arg 1400	Ala Ala Asp Val	Lys 1405	Trp Glu Asp Gln	Ala 1410
Gly Ser 1415	Ser Pro Ile Leu	Ser 1420	Ile Thr Ile Ser	Glu 1425
Met Ser 1430	Ile Lys Asn Glu	Glu 1435	Glu Glu Gln Thr	Leu 1440
Ile Arg 1445	Thr Gly Leu Leu	Val 1450	Ile Ser Gly Leu	Phe 1455
Ile Pro 1460	Ile Thr Ala Ala	Ala 1465	Trp Tyr Leu Trp	Glu 1470
Gln Arg 1475	Ala Gly Val Leu	Trp 1480	Asp Val Pro Ser	Pro 1485
Gly Lys 1490	Ala Glu Leu Glu	Asp 1495	Gly Ala Tyr Arg	Ile 1500
Gly Ile 1505	Leu Gly Tyr Ser	Gln 1510	Ile Gly Ala Gly	Val 1515
Gly Thr 1520	Phe His Thr Met	Trp 1525	His Val Thr Arg	Gly 1530
Met His 1535	Lys Gly Lys Arg	Ile 1540	Glu Pro Thr Trp	Ala 1545
Lys Asp 1550	Leu Ile Ser Tyr	Gly 1555	Gly Gly Trp Lys	Leu 1560
Trp Lys 1565	Glu Gly Glu Glu	Val 1570	Gln Val Leu Ala	Leu 1575
Lys Asn	Pro Arg Ala Val	Gln	Thr Lys Pro Gly	Leu
			Phe Lys Thr	

1580	1585	1590
Asn Ala Gly Thr Ile Gly	Ala Val Ser Leu Asp	Phe Ser Pro Gly
1595	1600	1605
Thr Ser Gly Ser Pro Ile	Ile Asp Lys Lys Gly	Lys Val Val Gly
1610	1615	1620
Leu Tyr Gly Asn Gly Val	Val Thr Arg Ser Gly	Ala Tyr Val Ser
1625	1630	1635
Ala Ile Ala Gln Thr Glu	Lys Ser Ile Glu Asp	Asn Pro Glu Ile
1640	1645	1650
Glu Asp His Ile Phe Arg	Lys Arg Arg Leu Thr	Ile Met Asp Leu
1655	1660	1665
His Pro Gly Ala Gly Lys	Thr Lys Arg Tyr Leu	Pro Ala Ile Val
1670	1675	1680
Arg Glu Ala Ile Lys Arg	Gly Leu Arg Thr Leu	Ile Leu Ala Pro
1685	1690	1695
Thr Arg Val Val Ala Ala	Glu Met Glu Glu Ala	Leu Arg Gly Leu
1700	1705	1710
Pro Ile Arg Tyr Gln Thr	Pro Ala Ile Arg Ala	Glu His Thr Gly
1715	1720	1725
Arg Glu Ile Val Asp Leu	Met Cys His Ala Thr	Phe Thr Met Arg
1730	1735	1740
Leu Leu Ser Pro Val Arg	Val Pro Asn Tyr Asn	Leu Ile Ile Met
1745	1750	1755
Asp Glu Ala His Phe Thr	Asp Pro Ala Ser Ile	Ala Ala Arg Gly
1760	1765	1770
Tyr Ile Ser Thr Arg Val	Glu Met Gly Glu Ala	Ala Gly Ile Phe
1775	1780	1785
Met Thr Ala Thr Pro Pro	Gly Ser Arg Asp Pro	Phe Pro Gln Ser
1790	1795	1800
Asn Ala Pro Ile Ile Asp	Glu Glu Arg Glu Ile	Pro Glu Arg Ser
1805	1810	1815
Trp Asn Ser Gly His Glu	Trp Val Thr Asp Phe	Lys Gly Lys Thr
1820	1825	1830
Val Trp Phe Val Pro Ser Ile	Lys Ala Gly Asn Asp	Ile Ala Ala

1835					1840					1845				
Cys	Leu	Arg	Lys	Asn	Gly	Lys	Lys	Val	Ile	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys
	1850					1855					1860			
Thr	Phe	Asp	Ser	Glu	Tyr	Val	Lys	Thr	Arg	Thr	Asn	Asp	Trp	Asp
	1865					1870					1875			
Phe	Val	Val	Thr	Thr	Asp	Ile	Ser	Glu	Met	Gly	Ala	Asn	Phe	Lys
	1880					1885					1890			
Ala	Glu	Arg	Val	Ile	Asp	Pro	Arg	Arg	Cys	Met	Lys	Pro	Val	Ile
	1895					1900					1905			
Leu	Thr	Asp	Gly	Glu	Glu	Arg	Val	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Met	Pro
	1910					1915					1920			
Val	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Ala	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Gly	Arg
	1925					1930					1935			
Asn	Pro	Lys	Asn	Glu	Asn	Asp	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Met	Gly	Glu	Pro
	1940					1945					1950			
Leu	Glu	Asn	Asp	Glu	Asp	Cys	Ala	His	Trp	Lys	Glu	Ala	Lys	Met
	1955					1960					1965			
Leu	Leu	Asp	Asn	Ile	Asn	Thr	Pro	Glu	Gly	Ile	Ile	Pro	Ser	Met
	1970					1975					1980			
Phe	Glu	Pro	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ile	Asp	Gly	Glu	Tyr
	1985					1990					1995			
Arg	Leu	Arg	Gly	Glu	Ala	Arg	Lys	Thr	Phe	Val	Asp	Leu	Met	Arg
	2000					2005					2010			
Arg	Gly	Asp	Leu	Pro	Val	Trp	Leu	Ala	Tyr	Arg	Val	Ala	Ala	Glu
	2015					2020					2025			
Gly	Ile	Asn	Tyr	Ala	Asp	Arg	Arg	Trp	Cys	Phe	Asp	Gly	Val	Lys
	2030					2035					2040			
Asn	Asn	Gln	Ile	Leu	Glu	Glu	Asn	Val	Glu	Val	Glu	Ile	Trp	Thr
	2045					2050					2055			
Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Pro	Arg	Trp	Leu	Asp	Ala
	2060					2065					2070			
Arg	Ile	Tyr	Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Leu	Lys	Glu	Phe	Lys	Glu	Phe
	2075					2080					2085			
Ala	Ala	Gly	Arg	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Ile	Thr	Glu	Met

2090					2095					2100				
Gly	Arg	Leu	Pro	Thr	Phe	Met	Thr	Gln	Lys	Ala	Arg	Asp	Ala	Leu
	2105					2110					2115			
Asp	Asn	Leu	Ala	Val	Leu	His	Thr	Ala	Glu	Ala	Gly	Gly	Arg	Ala
	2120					2125					2130			
Tyr	Asn	His	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Thr	Leu
	2135					2140					2145			
Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Gly	Ile	Phe	Leu
	2150					2155					2160			
Phe	Leu	Met	Ser	Ala	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Met	Thr	Leu	Gly	Met
	2165					2170					2175			
Cys	Cys	Ile	Ile	Thr	Ala	Ser	Ile	Leu	Leu	Trp	Tyr	Ala	Gln	Ile
	2180					2185					2190			
Gln	Pro	His	Trp	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Ile	Leu	Glu	Phe	Phe	Leu
	2195					2200					2205			
Ile	Val	Leu	Leu	Ile	Pro	Glu	Pro	Glu	Lys	Gln	Arg	Thr	Pro	Gln
	2210					2215					2220			
Asp	Asn	Gln	Leu	Thr	Tyr	Val	Val	Ile	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Val
	2225					2230					2235			
Ala	Ala	Thr	Met	Ala	Asn	Glu	Met	Gly	Phe	Leu	Glu	Lys	Thr	Lys
	2240					2245					2250			
Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Ser	Ile	Ala	Thr	Gln	Gln	Pro	Glu	Ser
	2255					2260					2265			
Asn	Ile	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Arg	Pro	Ala	Ser	Ala	Trp	Thr	Leu
	2270					2275					2280			
Tyr	Ala	Val	Ala	Thr	Thr	Phe	Val	Thr	Pro	Met	Leu	Arg	His	Ser
	2285					2290					2295			
Ile	Glu	Asn	Ser	Ser	Val	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Asn
	2300					2305					2310			
Gln	Ala	Thr	Val	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Lys	Gly	Trp	Pro	Leu	Ser
	2315					2320					2325			
Lys	Met	Asp	Ile	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile	Gly	Cys	Tyr	Ser
	2330					2335					2340			
Gln	Val	Asn	Pro	Ile	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	Val

2345	2350	2355
Ala His 2360	Tyr Ala Ile Ile Gly 2365	Pro Gly Leu Gln Ala Lys Ala Thr 2370
Arg Glu 2375	Ala Gln Lys Arg Ala 2380	Ala Ala Gly Ile Met Lys Asn Pro 2385
Thr Val 2390	Asp Gly Ile Thr Val 2395	Ile Asp Leu Asp Pro Ile Pro Tyr 2400
Asp Pro 2405	Lys Phe Glu Lys Gln 2410	Leu Gly Gln Val Met Leu Leu Val 2415
Leu Cys 2420	Val Thr Gln Val Leu 2425	Met Met Arg Thr Thr Trp Ala Leu 2430
Cys Glu 2435	Ala Leu Thr Leu Ala 2440	Thr Gly Pro Ile Ser Thr Leu Trp 2445
Glu Gly 2450	Asn Pro Gly Arg Phe 2455	Trp Asn Thr Thr Ile Ala Val Ser 2460
Met Ala 2465	Asn Ile Phe Arg Gly 2470	Ser Tyr Leu Ala Gly Ala Gly Leu 2475
Leu Phe 2480	Ser Ile Met Lys Asn 2485	Thr Thr Asn Thr Arg Arg Gly Thr 2490
Gly Asn 2495	Ile Gly Glu Thr Leu 2500	Gly Glu Lys Trp Lys Ser Arg Leu 2505
Asn Ala 2510	Leu Gly Lys Ser Glu 2515	Phe Gln Ile Tyr Lys Lys Ser Gly 2520
Ile Gln 2525	Glu Val Asp Arg Thr 2530	Leu Ala Lys Glu Gly Ile Lys Arg 2535
Gly Glu 2540	Thr Asp His His Ala 2545	Val Ser Arg Gly Ser Ala Lys Leu 2550
Arg Trp 2555	Phe Val Glu Arg Asn 2560	Met Val Thr Pro Glu Gly Lys Val 2565
Val Asp 2570	Leu Gly Cys Gly Arg 2575	Gly Gly Trp Ser Tyr Tyr Cys Gly 2580
Gly Leu 2585	Lys Asn Val Arg Glu 2590	Val Lys Gly Leu Thr Lys Gly Gly 2595
Pro Gly	His Glu Glu Pro Ile	Pro Met Ser Thr Tyr Gly Trp Asn

2600					2605					2610				
Leu	Val	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Asp	Val	Phe	Phe	Ile	Pro	Pro
	2615					2620					2625			
Glu	Lys	Cys	Asp	Thr	Leu	Leu	Cys	Asp	Ile	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro
	2630					2635					2640			
Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Ala	Gly	Arg	Thr	Leu	Arg	Val	Leu	Asn	Leu
	2645					2650					2655			
Val	Glu	Asn	Trp	Leu	Asn	Asn	Asn	Thr	Gln	Phe	Cys	Ile	Lys	Val
	2660					2665					2670			
Leu	Asn	Pro	Tyr	Met	Pro	Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Met	Glu	Ala	Leu
	2675					2680					2685			
Gln	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Leu	Ser	Arg
	2690					2695					2700			
Asn	Ser	Thr	His	Glu	Met	Tyr	Trp	Val	Ser	Asn	Ala	Ser	Gly	Asn
	2705					2710					2715			
Ile	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Met	Ile	Ser	Arg	Met	Leu	Ile	Asn	Arg
	2720					2725					2730			
Phe	Thr	Met	Arg	Tyr	Lys	Lys	Ala	Thr	Tyr	Glu	Pro	Asp	Val	Asp
	2735					2740					2745			
Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Ile	Gly	Ile	Glu	Ser	Glu	Ile	Pro
	2750					2755					2760			
Asn	Leu	Asp	Ile	Ile	Gly	Lys	Arg	Ile	Glu	Lys	Ile	Lys	Gln	Glu
	2765					2770					2775			
His	Glu	Thr	Ser	Trp	His	Tyr	Asp	Gln	Asp	His	Pro	Tyr	Lys	Thr
	2780					2785					2790			
Trp	Ala	Tyr	His	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Lys	Gln	Thr	Gly	Ser	Ala
	2795					2800					2805			
Ser	Ser	Met	Val	Asn	Gly	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Thr	Lys	Pro	Trp
	2810					2815					2820			
Asp	Val	Val	Pro	Met	Val	Thr	Gln	Met	Ala	Met	Thr	Asp	Thr	Thr
	2825					2830					2835			
Pro	Phe	Gly	Gln	Gln	Arg	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg
	2840					2845					2850			
Thr	Gln	Glu	Pro	Lys	Glu	Gly	Thr	Lys	Lys	Leu	Met	Lys	Ile	Thr

2855	2860	2865
Ala Glu Trp Leu Trp Lys Glu 2870	Leu Gly Lys Lys Glu 2875	Lys Thr Pro Arg 2880
Met Cys Thr Arg Glu Glu Phe 2885	Thr Arg Lys Val Arg 2890	Ser Asn Ala 2895
Ala Leu Gly Ala Ile Phe Thr 2900	Asp Glu Asn Lys Trp 2905	Lys Ser Ala 2910
Arg Glu Ala Val Glu Asp Ser 2915	Arg Phe Trp Glu Leu 2920	Val Asp Lys 2925
Glu Arg Asn Leu His Leu Glu 2930	Gly Lys Cys Glu Thr 2935	Cys Val Tyr 2940
Asn Met Met Gly Lys Arg Glu 2945	Lys Lys Leu Gly Glu 2950	Phe Gly Lys 2955
Ala Lys Gly Ser Arg Ala Ile 2960	Trp Tyr Met Trp Leu 2965	Gly Ala Arg 2970
Phe Leu Glu Phe Glu Ala Leu 2975	Gly Phe Leu Asn Glu 2980	Asp His Trp 2985
Phe Ser Arg Glu Asn Ser Leu 2990	Ser Gly Val Glu Gly 2995	Glu Gly Leu 3000
His Lys Leu Gly Tyr Ile Leu 3005	Arg Asp Val Ser Lys 3010	Lys Glu Gly 3015
Gly Ala Met Tyr Ala Asp Asp 3020	Thr Ala Gly Trp Asp 3025	Thr Lys Ile 3030
Thr Leu Glu Asp Leu Lys Asn 3035	Glu Glu Met Val Thr 3040	Asn His Met 3045
Glu Gly Glu His Lys Lys Leu 3050	Ala Glu Ala Ile Phe 3055	Lys Leu Thr 3060
Tyr Gln Asn Lys Val Val Arg 3065	Val Gln Arg Pro Thr 3070	Pro Arg Gly 3075
Thr Val Met Asp Ile Ile Ser 3080	Arg Arg Asp Gln Arg 3085	Gly Ser Gly 3090
Gln Val Gly Thr Tyr Gly Leu 3095	Asn Thr Phe Thr Asn 3100	Met Glu Ala 3105
Gln Leu Ile Arg Gln Met Glu	Gly Glu Gly Val Phe	Lys Ser Ile

3110				3115				3120						
Gln	His	Leu	Thr	Ile	Thr	Glu	Glu	Ile	Ala	Val	Gln	Asn	Trp	Leu
	3125					3130					3135			
Ala	Arg	Val	Gly	Arg	Glu	Arg	Leu	Ser	Arg	Met	Ala	Ile	Ser	Gly
	3140					3145					3150			
Asp	Asp	Cys	Val	Val	Lys	Pro	Leu	Asp	Asp	Arg	Phe	Ala	Ser	Ala
	3155					3160					3165			
Leu	Thr	Ala	Leu	Asn	Asp	Met	Gly	Lys	Ile	Arg	Lys	Asp	Ile	Gln
	3170					3175					3180			
Gln	Trp	Glu	Pro	Ser	Arg	Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Thr	Gln	Val	Pro
	3185					3190					3195			
Phe	Cys	Ser	His	His	Phe	His	Glu	Leu	Ile	Met	Lys	Asp	Gly	Arg
	3200					3205					3210			
Val	Leu	Val	Val	Pro	Cys	Arg	Asn	Gln	Asp	Glu	Leu	Ile	Gly	Arg
	3215					3220					3225			
Ala	Arg	Ile	Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	Trp	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Ala
	3230					3235					3240			
Cys	Leu	Gly	Lys	Ser	Tyr	Ala	Gln	Met	Trp	Ser	Leu	Met	Tyr	Phe
	3245					3250					3255			
His	Arg	Arg	Asp	Leu	Arg	Leu	Ala	Ala	Asn	Ala	Ile	Cys	Ser	Ala
	3260					3265					3270			
Val	Pro	Ser	His	Trp	Val	Pro	Thr	Ser	Arg	Thr	Thr	Trp	Ser	Ile
	3275					3280					3285			
His	Ala	Lys	His	Glu	Trp	Met	Thr	Thr	Glu	Asp	Met	Leu	Thr	Val
	3290					3295					3300			
Trp	Asn	Arg	Val	Trp	Ile	Gln	Glu	Asn	Pro	Trp	Met	Glu	Asp	Lys
	3305					3310					3315			
Thr	Pro	Val	Glu	Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Tyr	Leu	Gly	Lys	Arg
	3320					3325					3330			
Glu	Asp	Gln	Trp	Cys	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Thr	Ser	Arg	Ala
	3335					3340					3345			
Thr	Trp	Ala	Lys	Asn	Ile	Gln	Ala	Ala	Ile	Asn	Gln	Val	Arg	Ser
	3350					3355					3360			
Leu	Ile	Gly	Asn	Glu	Glu	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Met	Pro	Ser	Met	Lys

3365 3370 3375

Arg Phe Arg Arg Glu Glu Glu Glu Ala Gly Val Leu Trp
3380 3385 3390

<210> 3
<211> 10723
<212> DNA
<213> Vírus da Dengue

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10723)
<223> Wild-type DEN2 strain 16681

<400> 3

```

agttgtagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaacgta      60
gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg      120
aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgcaacag      180
ctgacaaaga gattctcact tggaatgctg cagggacgag gaccattaaa actgttcattg      240
gccctggtgg cgttccttcg tttcctaaca atcccaccaa cagcagggat attgaagaga      300
tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gaggggttcag gaaagagatt      360
ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg      420
attccaacag tgatggcggt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgctc      480
agcagacaag agaaagggaa aagtcttctg tttaaaacag aggatggcgt gaacatgtgt      540
accctcatgg ccatggacct tggatgaattg tgtgaagaca caatcacgta caagtgtccc      600
cttctcaggc agaatgagcc agaagacata gactgttggg gcaactctac gtccacgtgg      660
gtaacttatg ggacgtgtac caccatggga gaacatagaa gagaaaaaag atcagtggca      720
ctcgttccac atgtgggaat gggactggag acacgaactg aaacatggat gtcacagaa      780
ggggcctgga aacatgtcca gagaattgaa acttggatct tgagacatcc aggccttcacc      840
atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttccaaag agccctgatt      900
ttcatcttac tgacagctgt cactccttca atgacaatgc gttgcatagg aatgtcaaatt      960
agagactttg tggaaggggt ttcaggagga agctgggttg acatagtctt agaacatgga     1020
agctgtgtga cgacgatggc aaaaaacaaa ccaacattgg attttgaact gataaaaaca     1080
gaagccaaac agcctgccac cctaagggaag tactgtatag aggcaaagct aaccaacaca     1140
acaacagaat ctgctgccc aacacaaggg gaaccagacc taaatgaaga gcaggacaaa     1200
aggttcgtct gcaaacactc catggttagac agaggatggg gaaatggatg tggactatct     1260
ggaaagggag gcattgtgac ctgtgctatg ttcagatgca aaaagaacat ggaaggaaaa     1320
gttgtgcaac cagaaaactt ggaatacacc attgtgataa caccctactc aggggaagag     1380
catgcagtcg gaaatgacac aggaaaacat ggcaaggaaa tcaaaataac accacagagt     1440
tccatcacag aagcagaatt gacaggttat ggcactgtca caatggagtg ctctccaaga     1500

```

acgggcctcg	acttcaatga	gatggtgttg	ctgcagatgg	aaaataaagc	ttggctggtg	1560
cacaggcaat	ggttcctaga	cctgccgtta	ccatggttgc	ccggagcggg	cacacaaggg	1620
tcaaattgga	tacagaaaga	gacattggtc	actttcaaaa	atcccatg	gaagaaacag	1680
gatgttgttg	ttttaggatc	ccaagaaggg	gccatgcaca	cagcacttac	aggggccaca	1740
gaaatccaaa	tgtcatcagg	aaacttactc	ttcacaggac	atctcaagt	caggctgaga	1800
atggacaagc	tacagctcaa	aggaatgtca	tactctatgt	gcacaggaaa	gtttaaagtt	1860
gtgaaggaaa	tagcagaaac	acaacatgga	acaatagtta	tcagagtgc	atatgaaggg	1920
gacggctctc	catgcaagat	cccttttgag	ataatggatt	tggaaaaaag	acatgtctta	1980
ggtcgcctga	ttacagtcaa	ccaattgtg	acagaaaaag	atagcccagt	caacatagaa	2040
gcagaacctc	cattcggaga	cagctacatc	atcataggag	tagagccggg	acaactgaag	2100
ctcaactgg	ttaagaaagg	aagttctatc	ggccaaatgt	ttgagacaac	aatgaggggg	2160
gcgaagagaa	tggccatttt	aggtgacaca	gcctgggatt	ttggatcctt	gggaggagt	2220
tttacatct	taggaaaggc	tctccaccaa	gtctttggag	caatctatgg	agctgccttc	2280
agtggggttt	catggactat	gaaaatcctc	ataggagtca	ttatcacatg	gataggaatg	2340
aattcacgca	gcacctcact	gtctgtgaca	ctagtattgg	tgggaattgt	gacactgtat	2400
ttgggagtca	tgggtgcaggc	cgatagtgg	tgcgttgtga	gctggaaaaa	caaagaactg	2460
aaatgtggca	gtgggatttt	catcacagac	aacgtgcaca	catggacaga	acaatacaag	2520
ttccaaccag	aatccccttc	aaaactagct	tcagctatcc	agaaagccca	tgaagagggc	2580
atttgtggaa	tccgctcagt	aacaagactg	gagaatctga	tgtggaaaca	aataacacca	2640
gaattgaatc	acattctatc	agaaaatgag	gtgaagttaa	ctattatgac	aggagacatc	2700
aaaggaatca	tgcaggcagg	aaaacgatct	ctgcggcctc	agcccatga	gctgaagtat	2760
tcattggaaa	catggggcaa	agcaaaaatg	ctctctacag	agtctcataa	ccagaccttt	2820
ctcattgatg	gccccgaaac	agcagaatgc	cccaacacaa	atagagcttg	gaattcgttg	2880
gaagttgaag	actatggctt	tggagtattc	accaccaata	tatggctaaa	attgaaagaa	2940
aaacaggatg	tattctgcga	ctcaaaactc	atgtcagcgg	ccataaaaga	caacagagcc	3000
gtccatgccg	atatgggtta	ttggatagaa	agtgcactca	atgacacatg	gaagatagag	3060
aaagcctctt	tcattgaagt	taaaaactgc	cactggccaa	aatcacacac	cctctggagc	3120
aatggagtgc	tagaaagtga	gatgataatt	ccaaagaatc	tcgctggacc	agtgtctcaa	3180
cacaactata	gaccaggcta	ccatacacia	ataacaggac	catggcatct	aggtagctt	3240
gagatggact	ttgatttctg	tgatggaaca	acagtggtag	tgactgagga	ctgcggaaat	3300
agaggaccct	ctttgagaac	aaccactgcc	tctggaaaac	tcataacaga	atggtgctgc	3360
cgatcttgca	cattaccacc	gctaagatac	agaggtgagg	atgggtgctg	gtacgggatg	3420
gaaatcagac	cattgaagga	gaaagaagag	aatttggtca	actccttggt	cacagctgga	3480
catgggcagg	tcgacaactt	ttcactagga	gtcttgggaa	tggcattgtt	cctggaggaa	3540

atgcttagga	cccgagtagg	aacgaaacat	gcaatactac	tagttgcagt	ttcttttgtg	3600
acattgatca	cagggaacat	gtccttttaga	gacctgggaa	gagtgatggt	tatggttaggc	3660
gccactatga	cggatgacat	aggtatgggc	gtgacttatc	ttgccctact	agcagccttc	3720
aaagtcagac	caacttttgc	agctggacta	ctcttgagaa	agctgacctc	caaggaattg	3780
atgatgacta	ctataggaat	tgtactcctc	tcccagagca	ccataccaga	gaccattctt	3840
gagttgactg	atgctgtagc	cttaggcattg	atggctcctca	aaatggtgag	aaatatggaa	3900
aagtatcaat	tggcagtgac	tatcatggct	atcttgtgcg	teccaaacgc	agtgatatta	3960
caaaacgc	gaaagttagg	ttgcacaata	ttggcagtg	tgtccgtttc	cccactgctc	4020
ttaacatcct	cacagcaaaa	aacagattgg	ataccattag	cattgacgat	caaaggcttc	4080
aatccaacag	ctatttttct	aacaaccctc	tcaagaacca	gcaagaaaag	gagctggcca	4140
ttaaattgagg	ctatcatggc	agtcgggatg	gtgagcattt	tagccagttc	tctcctaaaa	4200
aatgatattc	ccatgacagg	accatttagtg	gctggagggc	tcctcactgt	gtgctacgtg	4260
ctcactggac	gatcggccga	tttggaaactg	gagagagcag	ccgatgtcaa	atgggaagac	4320
caggcagaga	tatcaggaag	cagtccaatc	ctgtcaataa	caatatcaga	agatggtagc	4380
atgtcgataa	aaaatgaaga	ggaagaacaa	acactgacca	tactcattag	aacaggattg	4440
ctggtgatct	caggactttt	tcctgtatca	ataccaatca	cggcagcagc	atggtacctg	4500
tgggaagtga	agaaacaacg	ggccggagta	ttgtgggatg	ttccttcacc	cccacccatg	4560
ggaaaggctg	aactggaaga	tggagcctat	agaattaagc	aaaaagggat	tcttggatat	4620
tcccagatcg	gagccggagt	ttacaagaa	ggaacattcc	atacaatgtg	gcatgtcaca	4680
cgtggcgctg	ttctaattga	taaaggaaag	aggattgaac	catcatgggc	ggacgtcaag	4740
aaagacctaa	tatcatatgg	aggaggctgg	aagttagaag	gagaatggaa	ggaaggagaa	4800
gaagtccagg	tattggcact	ggagcctgga	aaaaatccaa	gagccgtcca	aacgaaacct	4860
ggtcttttca	aaaccaacgc	cggacaataa	ggtgctgtat	ctctggactt	ttctcctgga	4920
acgtcaggat	ctccaattat	cgacaaaaaa	ggaaaagttg	tgggtcttta	tggtaatggt	4980
gttgttacaa	ggagtggagc	atatgtgagt	gctatagccc	agactgaaaa	aagcattgaa	5040
gacaaccag	agatcgaaga	tgacattttc	cgaaagagaa	gactgaccat	catggacctc	5100
caccaggag	cggaagagac	gaagagatac	cttccggcca	tagtcagaga	agctataaaa	5160
cggggtttga	gaacattaat	cttggccccc	actagagttg	tggcagctga	aatggaggaa	5220
gcccttagag	gacttccaat	aagataccag	acccagcca	tcagagctga	gcacaccggg	5280
cgggagattg	tggacctaat	gtgtcatgcc	acatttacca	tgaggctgct	atcaccagtt	5340
agagtgccaa	actacaacct	gattatcatg	gacgaagccc	atttcacaga	cccagcaagt	5400
atagcagcta	gaggatacat	ctcaactcga	gtggagatgg	gtgaggcagc	tgggattttt	5460
atgacagcca	ctccccggg	aagcagagac	ccatttcctc	agagcaatgc	accaatcata	5520
gatgaagaaa	gagaaatccc	tgaacgttcg	tggaaattccg	gacatgaatg	ggtcacggat	5580

tttaaagggg	agactgtttg	gttcgttcca	agtataaaag	caggaaatga	tatagcagct	5640
tgcctgagga	aaaatggaaa	gaaagtgata	caactcagta	ggaagacctt	tgattctgag	5700
tatgtcaaga	ctagaacca	tgattgggac	ttcgtgggta	caactgacat	ttcagaaatg	5760
ggtgccatt	tcaaggctga	gaggggtata	gaccccagac	gctgcatgaa	accagtcata	5820
ctaacagatg	gtgaagagcg	ggtgattctg	gcaggaccta	tgccagtgc	ccactctagt	5880
gcagcacaaa	gaagagggag	aataggaaga	aatccaaaaa	atgagaatga	ccagtacata	5940
tacatggggg	aacctctgga	aatgatgaa	gactgtgcac	actggaaaga	agctaaaatg	6000
ctcctagata	acatcaacac	gccagaagga	atcattccta	gcatgttcga	accagagcgt	6060
gaaaaggtg	atgccattga	tggcgaatac	cgcttgagag	gagaagcaag	gaaaaccttt	6120
gtagacttaa	tgagaagagg	agacctacca	gtctgggttg	cctacagagt	ggcagctgaa	6180
ggcatcaact	acgcagacag	aagggtggtg	tttgatggag	tcaagaacaa	ccaaatccta	6240
gaagaaaacg	tggaagttga	aatctggaca	aaagaagggg	aaaggaagaa	attgaaaccc	6300
agatgggttg	atgctaggat	ctattctgac	ccactggcgc	taaaagaatt	taaggaattt	6360
gcagccggaa	gaaagtctct	gacctgaac	ctaatacacag	aaatgggtag	gctcccaacc	6420
ttcatgactc	agaaggcaag	agacgcactg	gacaacttag	cagtgtctga	cacggctgag	6480
gcaggtggaa	gggcgtacaa	ccatgctctc	agtgaactgc	cggagaccct	ggagacattg	6540
cttttactga	cacttctggc	tacagtcacg	ggagggatct	ttttattctt	gatgagcgga	6600
aggggcatag	ggaagatgac	cctgggaatg	tgctgcataa	tcacggctag	catcctccta	6660
tggtacgcac	aaatacagcc	acactggata	gcagcttcaa	taatactgga	gttttttctc	6720
atagttttgc	ttattccaga	acctgaaaaa	cagagaacac	ccaagacaa	ccaactgacc	6780
tacgttgta	tagccatcct	cacagtgggtg	gccgcaacca	tggcaaacga	gatgggtttc	6840
ctagaaaaaa	cgaagaaaga	tctcggattg	ggaagcattg	caaccagca	acccgagagc	6900
aacatcctgg	acatagatct	acgtcctgca	tcagcatgga	cgctgtatgc	cgtggccaca	6960
acatttggtta	caccaatggt	gagacatagc	attgaaaatt	cctcagtga	tgtgtcccta	7020
acagctatag	ccaaccaagc	cacagtgtta	atgggtctcg	ggaaaggatg	gccattgtca	7080
aagatggaca	tcggagttcc	ccttctcgcc	attggatgct	actcacaagt	caaccccata	7140
actctcacag	cagctctttt	cttattggta	gcacattatg	ccatcatagg	gccaggactc	7200
caagcaaaag	caaccagaga	agctcagaaa	agagcagcgg	cgggcatcat	gaaaaaccca	7260
actgtcgatg	gaataacagt	gattgacctt	gatccaatac	cttatgatcc	aaagtttgaa	7320
aagcagttgg	gacaagtaat	gctcctagtc	ctctgcgtga	ctcaagtatt	gatgatgagg	7380
actacatggg	ctctgtgtga	ggctttaacc	ttagctaccg	ggcccatctc	cacattgtgg	7440
gaaggaaatc	cagggagggtt	ttggaacact	accattgcgg	tgtcaatggc	taacattttt	7500
agagggagtt	acttggccgg	agctggactt	ctcttttcta	ttatgaagaa	cacaaccaac	7560
acaagaaggg	gaactggcaa	cataggagag	acgcttgagg	agaaatggaa	aagccgattg	7620

aacgcattgg	gaaaaagtga	attccagatc	tacaagaaaa	gtggaatcca	ggaagtggat	7680
agaacCttag	caaaaagaagg	cattaaaaga	ggagaaaacgg	accatcacgc	tgtgtcgcga	7740
ggctcagcaa	aactgagatg	gttcgttgag	agaaacatgg	tcacaccaga	agggaaagta	7800
gtggacctcg	gttgtggcag	aggaggctgg	tcatactatt	gtggaggact	aaagaatgta	7860
agagaagtca	aaggcctaac	aaaaggagga	ccaggacacg	aagaacccat	ccccatgtca	7920
acatatgggt	ggaatctagt	gcgtcttcaa	agtggagttg	acgttttctt	catcccgccca	7980
gaaaagtgtg	acacattatt	gtgtgacata	ggggagtcac	caccaaacc	cacagtggaa	8040
gcaggacgaa	cactcagagt	ccttaactta	gtagaaaatt	ggttgaacaa	caacactcaa	8100
ttttgcataa	aggttctcaa	cccatatatg	ccctcagtc	tagaaaaaat	ggaagcacta	8160
caaaggaaat	atggaggagc	cttagtgagg	aatccactct	cacgaaactc	cacacatgag	8220
atgtactggg	tatccaatgc	ttccgggaac	atagtgtcat	cagtgaacat	gatttcaagg	8280
atgttgatca	acagatttac	aatgagatac	aagaaagcca	cttacgagcc	ggatgttgac	8340
ctcggaaagcg	gaaccgtaa	catcgggatt	gaaagtgaga	taccaaacc	agatataatt	8400
gggaaaagaa	tagaaaaaat	aaagcaagag	catgaaacat	catggcacta	tgaccaagac	8460
cacccataca	aaacgtgggc	ataccatggg	agctatgaaa	caaaacagac	tggatcagca	8520
tcatccatgg	tcaacggagt	ggtcaggctg	ctgacaaaac	cttgggacgt	cgtcccccag	8580
gtgacacaga	tggcaatgac	agacacgact	ccatttggac	aacagcgcgt	ttttaagag	8640
aaagtggaca	cgagaacca	agaaccgaaa	gaaggcacga	agaaactaat	gaaaataaca	8700
gcagagtggc	tttggaaaga	attagggag	aaaaagacac	ccaggatgtg	caccagagaa	8760
gaattcaca	gaaagggtgag	aagcaatgca	gccttggggg	ccatattcac	tgatgagaac	8820
aagtggaaat	cggcacgtga	ggctgttgaa	gatagtaggt	tttgggagct	ggttgacaag	8880
gaaaggaatc	tccatcttga	aggaaagtgt	gaaacatgtg	tgtacaacat	gatgggaaaa	8940
agagagaaga	agctagggga	attcggcaag	gcaaaaggca	gcagagccat	atggtacatg	9000
tggcttggag	cacgcttctt	agagtttgaa	gccctaggat	tcttaaatga	agatcactgg	9060
ttctccagag	agaactccct	gagtggagtg	gaaggagaag	ggctgcacaa	gctagggttac	9120
attctaagag	acgtgagcaa	gaaagagggg	ggagcaatgt	atgccgatga	caccgcagga	9180
tgggatacaa	gaatcacact	agaagaccta	aaaaatgaag	aaatggtaac	aaaccacatg	9240
gaaggagaac	acaagaaact	agccgaggcc	attttcaaac	taacgtacca	aaacaagggtg	9300
gtgcgtgtgc	aaagaccaac	accaagaggc	acagtaatgg	acatcatatc	gagaagagac	9360
caaagaggta	gtggacaagt	tggcacctat	ggactcaata	ctttcaccaa	tatggaagcc	9420
caactaatca	gacagatgga	gggagaagga	gtctttaaaa	gcattcagca	cctaacaatc	9480
acagaagaaa	tcgctgtgca	aaactgggta	gcaagagtgg	ggcgcgaaag	gttatcaaga	9540
atggccatca	gtggagatga	ttgtgttgtg	aaacctttag	atgacagggt	cgcaagcgct	9600
ttaacagctc	taaatgacat	gggaaagatt	aggaaagaca	tacaacaatg	ggaaccttca	9660

agaggatgga atgattggac acaagtgtccc ttctgttcac accatttcca tgagttaatc 9720
 atgaaagacg gtcgcgtact cgttgttcca tgtagaaacc aagatgaact gattggcaga 9780
 gcccgaatct cccaaggagc aggggtggtct ttgcgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840
 tacgccc aaa tgtggagctt gatgtacttc cacagacgcg acctcaggct ggcggcaaat 9900
 gctatttgct cggcagtacc atcacattgg gttccaacaa gtcgaacaac ctggtccata 9960
 catgctaaac atgaatggat gacaacggaa gacatgctga cagtctggaa caggggtgtgg 10020
 attcaagaaa acccatggat ggaagacaaa actccagtgg aatcatggga ggaaatccca 10080
 tacttgggga aaagagaaga ccaatggtgc ggctcattga ttgggttaac aagcaggggcc 10140
 acctgggcaa agaacatcca agcagcaata aatcaagtta gatcccttat aggcaatgaa 10200
 gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaagcagga 10260
 gttctgtggt agaaagcaaa actaacatga aacaaggcta gaagtcagggt cggattaagc 10320
 catagtacgg aaaaaactat gctacctgtg agccccgtcc aaggacgtta aaagaagtca 10380
 ggccatcata aatgccatag cttgagtaaa ctatgcagcc tgtagctcca cctgagaagg 10440
 tgtaaaaaat ccgggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc 10500
 ggtagtagga gacccctccc ttacaaatcg cagcaacaat gggggcccaa ggcgagatga 10560
 agctgtagtc tcgctggaag gactagaggt tagaggagac cccccgaaa caaaaaacag 10620
 catattgacg ctgggaaaga ccagagatcc tgctgtctcc tcagcatcat tccaggcaca 10680
 gaacgccaga aaatggaatg gtgctgttga atcaacaggt tct 10723

<210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 4
 gttttccag tcacgacacg tggaccgaca aagacag 37

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 5
 aacagctatg accatgttcc tcctgaaacc ccttcc 36

<210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 6
gttttcccag tcacgacatc acgtacaagt gtcccc 36

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 7
aacagctatg accatgagca acaccatctc attgaag 37

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 8
gttttcccag tcacgactgc aaccagaaaa cttggaatac ac 42

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 9
aacagctatg accatggctc catagattgc tccaaagac 39

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 10
gttttcccag tcacgacccc agtcaacata gaagcagaac c 41

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 11
aacagctatg accatgcaa agccatagtc ttcaacttcc 40

<210> 12

<211> 36

<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	12	
	gttttccag tcacgacatc atgcaggcag gaaaac	36
<210>	13	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	13	
	aacagctatg accatgacca taaccatcac tcttccc	37
<210>	14	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	14	
	aacagctatg accatgacca taaccatcac tcttccc	37
<210>	15	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	15	
	aacagctatg accatggctc tctccagttc caaatc	36
<210>	16	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	16	
	gttttccag tcacgacaag aaccagcaag aaaaggag	38
<210>	17	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	17	
	aacagctatg accatgcacc attaccataa agaccac	38

<210> 18
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 18
 gttttccag tcacgacttg aaccatcatg ggcggac

37

<210> 19
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 19
 aacagctatg accatgtcct gcttttatac ttggaacgaa c

41

<210> 20
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 20
 gttttccag tcacgacaag cccatttcac agaccc

36

<210> 21
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 21
 aacagctatg accatgtcaa tttcttcctt tccccttc

38

<210> 22
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 22
 gttttccag tcacgacgag aggagaagca aggaaaac

38

<210> 23
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 23

aacagctatg accatgaggg acacattcac tgagg

35

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 24

gttttccag tcacgacaca gagaacaccc caagac

36

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 25

aacagctatg accatgtcca cttcctggat tccac

35

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 26

gttttccag tcacgacaca agtaatgctc ctagtcctc

39

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 27

aacagctatg accatgttca ctgatgacac tatgttcc

38

<210> 28

<211> 37

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> primer

<400> 28

gttttccag tcacgacgac atcaccaaatt cccacag

37

<210> 29

<211> 39

<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	priemr	
<400>	29	39
	aacagctatg accatggctt cttctctctt tttcccatc	
<210>	30	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	30	36
	gttttccag tcacgacaag gtgagaagca atgcag	
<210>	31	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	31	37
	aacagctatg accatgtgga aatggtgtga acagaag	
<210>	32	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	32	39
	gttttccag tcacgacgca ttcagcacct aacaatcac	
<210>	33	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	33	35
	aacagctatg accatgggca tttatgatgg cctga	
<210>	34	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	34	17
	ccatggaagc tgtacgc	

<210> 35
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 35
 aacagctatg accatgtgat tcaacagcac cattcc

36

<210> 36
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer tail

<400> 36
 gttttccag tcacgac

17

<210> 37
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Final do primer

<400> 37
 aacagctatg accatg

16

<210> 38
 <211> 10723
 <212> DNA
 <213> Vírus da Dengue

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10723)
 <223> LAV2

<400> 38
 agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaatgta 60
 gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120
 aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgcaacag 180
 ctgacaaaga gattctcact tggaatgctg cagggacgag gaccattaaa actgttcattg 240
 gccctggtgg cgttccttcg tttcctaaca atccaccaa cagcagggat attgaagaga 300
 tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gaggggttcag gaaagagatt 360
 ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg 420
 attccaacag tgatggcggt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgctc 480
 agcagacaag agaaagggaa aagtcttctg tttaaaacag aggttggcgt gaacatgtgt 540

accctcatgg	ccatggacct	tggatgaattg	tgtgaagaca	caatcacgta	caagtgtccc	600
cttctcaggg	agaatgagcc	agaagacata	gactgtttggt	gcaactctac	gtccacgtgg	660
gtaacttatg	ggacgtgtac	caccatggga	gaacatagaa	gagaaaaaag	atcagtggca	720
ctcgttccac	atgtgggaat	gggactggag	acacgaactg	aaacatggat	gtcatcagaa	780
ggggcctgga	aacatgtcca	gagaattgaa	acttggatct	tgagacatcc	aggcttcacc	840
atgatggcag	caatcctggc	atacaccata	ggaacgacac	atttccaaag	agccctgatt	900
ttcatcttac	tgacagctgt	cactccttca	atgacaatgc	gttgcatagg	aatgtcaaat	960
agagactttg	tggaaaggggt	ttcaggagga	agctggggtg	acatagtctt	agaacatgga	1020
agctgtgtga	cgacgatggc	aaaaaacaaa	ccaacattgg	attttgaact	gataaaaaaca	1080
gaagccaaac	agcctgccac	cctaagggaag	tactgtatag	aggcaaagct	aaccaacaca	1140
acaacagaat	ctcgtgccc	aacacaaggg	gaaccagcc	taaatgaaga	gcaggacaaa	1200
aggttcgtct	gcaaacactc	catggtagac	agaggatggg	gaaatggatg	tggactattt	1260
ggaaagggag	gcattgtgac	ctgtgctatg	ttcagatgca	aaaagaacat	ggaaggaaaa	1320
gttgtgcaac	cagaaaactt	ggaatacacc	attgtgataa	cacctcactc	aggggaagag	1380
catgcagtcg	gaaatgacac	aggaaaacat	ggcaaggaaa	tcaaaataac	accacagagt	1440
tcacatcacag	aagcagaatt	gacaggttat	ggcactgtca	caatggagtg	ctctccaaga	1500
acgggcctcg	acttcaatga	gatgggtgtg	ctgcagatgg	aaaataaagc	ttggctgggtg	1560
cacaggcaat	ggttcctaga	cctgccgtta	ccatggttgc	ccggagcgga	cacacaaggg	1620
tcaaattgga	tacagaaaga	gacattggtc	actttcaaaa	atccccatgc	gaagaaacag	1680
gatgtttgtg	ttttaggatc	ccaagaaggg	gccatgcaca	cagcacttac	aggggccaca	1740
gaaatccaaa	tgtcatcagg	aaacttactc	ttcacaggac	atctcaagtg	caggctgaga	1800
atggacaagc	tacagctcaa	aggaatgtca	tactctatgt	gcacaggaaa	gtttaaagtt	1860
gtgaaggaaa	tagcagaaac	acaacatgga	acaatagtta	tcagagtgca	atatgaaggg	1920
gacggctctc	catgcaagat	cccttttgag	ataatggatt	tggaaaaaag	acatgtctta	1980
ggtcgcctga	ttacagtcaa	ccaattgtg	acagaaaaag	atagcccagt	caacatagaa	2040
gcagaacctc	catttgagga	cagctacatc	atcataggag	tagagccggg	acaactgaag	2100
ctcaactggg	ttaagaaagg	aagttctatc	ggccaaatgt	ttgagacaac	aatgaggggg	2160
gcgaagagaa	tggccatttt	aggtgacaca	gcctgggatt	ttggatcctt	gggaggagtg	2220
tttacatcta	taggaaaggc	tctccaccaa	gtctttggag	caatctatgg	agctgccttc	2280
agtgggggtt	catggactat	gaaaatcctc	ataggagtca	ttatcacatg	gataggaatg	2340
aattcacgca	gcacctcact	gtctgtgaca	ctagtattgg	tgggaattgt	gacactgtat	2400
ttgggagtca	tgggtgcaggc	cgatagtggg	tgcgttgtga	gctggaaaaa	caaagaactg	2460
aaatgtggca	gtgggatttt	catcacagac	aacgtgcaca	catggacaga	acaatacaag	2520
ttccaaccag	aatccccctt	aaaactagct	tcagctatcc	agaaagccca	tgaagaggac	2580

at ttgtggaa	tccgctcagt	aacaagactg	gagaatctga	tgtggaaaca	aataacacca	2640
gaattgaatc	acattctatc	agaaaatgag	gtgaagttaa	ctattatgac	aggagacatc	2700
aaaggaatca	tgcaggcagg	aaaacgatct	ctgcggcctc	agcccactga	gctgaagtat	2760
tcatggaaaa	catggggcaa	agcaaaaatg	ctctctacag	agtctcataa	ccagaccttt	2820
ctcattgatg	gccccgaaac	agcagaatgc	cccaacacaa	atagagcttg	gaattcgttg	2880
gaagttgaag	actatggctt	tggagtattc	accaccaata	tatggctaaa	attgaaagaa	2940
aaacaggatg	tattctgcga	ctcaaaactc	atgtcagcgg	ccataaaaga	caacagagcc	3000
gtccatgccg	atatgggtta	ttggatagaa	agtgcactca	atgacacatg	gaagatagag	3060
aaagcctctt	tcattgaagt	taaaaactgc	cactggccaa	aatcacacac	cctctggagc	3120
aatggagtgc	tagaaagtga	gatgataatt	ccaagaatc	tcgctggacc	agtgctctca	3180
cacaactata	gaccaggcta	ccatacacia	ataacaggac	catggcatct	aggtaaactt	3240
gagatggact	ttgatttctg	tgatggaaca	acagtggtag	tgactgagga	ctgcggaaat	3300
agaggaccct	ctttgagaac	aaccactgcc	tctggaaaac	tcataacaga	atggtgctgc	3360
cgatcttgca	cattaccacc	gctaagatac	agaggtgagg	atgggtgctg	gtacgggatg	3420
gaaatcagac	cattgaagga	gaaagaagag	aatttgggtca	actccttggg	cacagctgga	3480
catgggcagg	tcgacaactt	ttcactagga	gtcttgggaa	tggcattgtt	cctggaggaa	3540
atgcttagga	cccagtagg	aacgaaacat	gcaatactac	tagttgcagt	ttcttttgtg	3600
acattgatca	cagggaacat	gtcctttaga	gacctgggaa	gagtgatggt	tatggtaggc	3660
gccactatga	cggatgacat	aggtatgggc	gtgacttata	ttgccctact	agcagccttc	3720
aaagtccagac	caacttttgc	agctggacta	ctcttgagaa	agctgacctc	caaggaattg	3780
atgatgacta	ctataggaat	tgtactcctc	tcccagagca	ccataccaga	gaccattctt	3840
gagttgactg	atgcgttagc	cttaggcatt	atggctctca	aaatgggtgag	aaatatggaa	3900
aagtatcaat	tggcagtgc	tatcatggct	atcttgtgcg	tcccaaaccg	agtgatatta	3960
caaaacgcac	ggaaagtgc	ttgcacaata	ttggcagtgg	tgtccgtttc	cccactgttc	4020
ttacatcct	cacagcaaaa	aacagattgg	ataccattag	cattgacgat	caaaggtctc	4080
aatccaacag	ctatttttct	aacaaccctc	tcaagaacca	gcaagaaaag	gagctggcca	4140
ttaaatgagg	ctatcatggc	agtcgggatg	gtgagcattt	tagccagttc	tctcctaaaa	4200
aatgatattc	ccatgacagg	accattagtg	gctggagggc	tcctcactgt	gtgctacgtg	4260
ctcactggac	gatcggccga	tttggaactg	gagagagcag	ccgatgtcaa	atgggaagac	4320
caggcagaga	tatcaggaag	cagtccaatc	ctgtcaataa	caatatcaga	agatggtagc	4380
atgtcgataa	aaaatgaaga	ggaagaacaa	acactgacca	tactcattag	aacaggattg	4440
ctggtgatct	caggactttt	tcctgtatca	ataccaatca	cggcagcagc	atggtacctg	4500
tgggaagtga	agaaacaacg	ggccggagta	ttgtgggatg	ttccttcacc	cccacccatg	4560
ggaaaggctg	aactggaaga	tggagcctat	agaattaagc	aaaaagggat	tcttggatat	4620

tcccagatcg	gagccggagt	ttacaaagaa	ggaacattcc	atacaatgtg	gcatgtcaca	4680
cgtggcgctg	ttctaattgca	taaaggaaag	aggattgaac	catcatgggc	ggacgtcaag	4740
aaagacctaa	tatcatatgg	aggaggctgg	aagttagaag	gagaatggaa	ggaaggagaa	4800
gaagtccagg	tattggcact	ggagcctgga	aaaaatccaa	gagccgtcca	aacgaaacct	4860
ggtcttttca	aaaccaacgc	cggaacaata	ggtgctgtat	ctctggactt	ttctcctgga	4920
acgtcaggat	ctccaattat	cgacaaaaaa	ggaaaagttg	tgggtcttta	tggtaatggt	4980
gttgttacaa	ggagtggagc	atatgtgagt	gctatagccc	agactgaaaa	aagcattgaa	5040
gacaacctag	agatcgaaga	tgacattttc	cgaaaagagaa	gactgacct	catggacctc	5100
cacctaggag	cgggaaagac	gaagagatac	cttccggcca	tagtcagaga	agctataaaa	5160
cggggtttga	gaacattaat	cttggccccc	actagagttg	tggcagctga	aatggaggaa	5220
gcccttagag	gacttccaat	aagataccag	accccagcca	tcagagctgw	gcacaccggg	5280
cgggagattg	tggacctaat	gtgtcatgcc	acattttacca	tgaggctgct	atcaccagtt	5340
agagtgccaa	actacaacct	gattatcatg	gacgaagccc	atttcacaga	cccagcaagt	5400
atagcagcta	gaggatacat	ctcaactcga	gtggagatgg	gtgaggcagc	tgggattttt	5460
atgacagcca	ctccccggg	aagcagagac	ccatttcctc	agagcaatgc	accaatcata	5520
gatgaagaaa	gagaaatccc	tgaacgctcg	tggaattccg	gacatgaatg	ggtcacggat	5580
tttaaaggga	agactgtttg	gttcgttcca	agtataaaag	caggaaatga	tatagcagct	5640
tgcttgagga	aaaatggaaa	gaaagtgata	caactcagta	ggaagacctt	tgattctgag	5700
tatgtcaaga	ctagaaccaa	tgattgggac	ttcgtggtta	caactgacat	ttcagaaatg	5760
ggtgccaat	tcaaggctga	gaggggtata	gaccccgagc	gctgcatgaa	accagtcata	5820
ctaacagatg	gtgaagagcg	ggtgattctg	gcaggaccta	tgccagtgac	ccactctagt	5880
gcagcacaaa	gaagagggag	aataggaaga	aatccaaaaa	atgagaatga	ccagtacata	5940
tacatggggg	aacctctgga	aatgatgaa	gactgtgcac	actggaaaga	agctaaaatg	6000
ctcctagata	acatcaacac	gccagaagga	atcattccta	gcatgttcga	accagagcgt	6060
gaaaagggtg	atgccattga	tggcgaatac	cgcttgagag	gagaagcaag	gaaaaccttt	6120
gtagacttaa	tgagaagagg	agacctacca	gtctgggttg	cctacagagt	ggcagctgaa	6180
ggcatcaact	acgcagacag	aagggtggtg	tttgatggag	tcaagaacaa	ccaaatccta	6240
gaagaaaacg	tggaagttga	aatctggaca	aaagaagggg	aaaggaagaa	attgaaaccc	6300
agatgggttg	atgctaggat	ctattctgac	ccactggcgc	taaaagaatt	taaggaattt	6360
gcagccggaa	gaaagtctct	gaccctgaac	ctaatacacag	aaatgggtag	gctcccaacc	6420
ttcatgactc	agaaggcaag	agacgcactg	gacaacttag	cagtgtctga	cacggctgag	6480
gcaggtggaa	gggcgtacaa	ccatgctctc	agtgaactgc	cggagaccct	ggagacattg	6540
cttttactga	cacttctggc	tacagtcacg	ggagggatct	ttttattctt	gatgagcgca	6600
aggggcatag	ggaagatgac	cctgggaatg	tgctgcataa	tcacggctag	catcctccta	6660

tggtacgcac	aaatacagcc	acactggata	gcagcttcaa	taatactgga	gttttttctc	6720
atagttttgc	ttattccaga	acctgaaaaa	cagagaacac	cccaagacaa	ccaactgacc	6780
tacgtttgtca	tagccatcct	cacagtgggtg	gccgcaacca	tggcaaacga	gatgggtttc	6840
ctagaaaaaa	cgaagaaaga	tctcggattg	ggaagcattg	caacccagca	acccgagagc	6900
aacatcctgg	acatagatct	acgtcctgca	tcagcatgga	cgctgtatgc	cgtggccaca	6960
acatttgтта	caccaatgtt	gagacatagc	attgaaaatt	cctcagtga	tgtgtcccta	7020
acagctatag	ccaaccaagc	cacagtgtta	atgggtctcg	ggaaaggatg	gccattgtca	7080
aagatggaca	tcggagttcc	ctttctcgcc	attggatgct	actcacaagt	caaccccata	7140
actctcacag	cagctctttt	cttattggta	gcacattatg	ccatcatagg	gccaggactc	7200
caagcaaaag	caaccagaga	agctcagaaa	agagcagcgg	cgggcatcat	gaaaaaccca	7260
actgtc gatg	gaataacagt	gattgaccta	gatccaatac	cttatgatcc	aaagtttgaa	7320
aagcagttgg	gacaagtaat	gctcctagtc	ctctgcgtga	ctcaagtatt	gatgatgagg	7380
actacatggg	ctctgtgtga	ggctttaacc	ttagctaccg	ggcccatctc	cacattgtgg	7440
gaaggaaatc	caggagggtt	ttggaacact	accattgcgg	tgtcaatggc	taacattttt	7500
agagggagtt	acttggccgg	agctggactt	ctcttttcta	ttatgaagaa	cacaaccaac	7560
acaagaaggg	gaactggcaa	cataggagag	acgcttggag	agaaatggaa	aagccgattg	7620
aacgcattgg	gaaaaagtga	attccagatc	tacaagaaaa	gtggaatcca	ggaagtggat	7680
agaaccttag	caaaagaagg	cattaaaaga	ggagaaacgg	accatcacgc	tgtgtcgcga	7740
ggctcagcaa	aactgagatg	gttcgttgag	agaaacatgg	tcacaccaga	agggaaagta	7800
gtggacctcg	gttgtggcag	aggaggctgg	tcatactatt	gtggaggact	aaagaatgta	7860
agagaagtca	aaggcctaac	aaaaggagga	ccaggacacg	aagaacccat	ccccatgtca	7920
acatatgggt	ggaatctagt	gcgtcttcaa	agtggagttg	acgttttctt	catcccgccca	7980
gaaaagtgtg	acacattatt	gtgtgacata	ggggagtcac	caccaaattc	cacagtggaa	8040
gcaggacgaa	cactcagagt	ccttaactta	gtagaaaatt	ggttgaacaa	caacactcaa	8100
ttttgcataa	aggtttctca	cccatatatg	ccctcagtca	tagaaaaaat	ggaagcacta	8160
caaaggaaat	atggaggagc	cttagtgagg	aatccactct	cacgaaactc	cacacatgag	8220
atgtactggg	tatccaatgc	ttccgggaac	atagtgtcat	cagtgaacat	gatttcaagg	8280
atgttgatca	acagatttac	aatgagatac	aagaaagcca	cttacgagcc	ggatgttgac	8340
ctcggaaagc	gaacccgtaa	catcgggatt	gaaagtgaga	taccaaacct	agatataatt	8400
gggaaaagaa	tagaaaaaat	aaagcaagag	catgaaacat	catggcacta	tgaccaagac	8460
caccataaca	aaacgtgggc	ataccatggt	agctatgaaa	caaaacagac	tggtatcgca	8520
tcatccatgg	tcaacggagt	ggtcaggctg	ctgacaaaac	cttgggacgt	tgtcccatg	8580
gtgacacaga	tggcaatgac	agacacgact	ccatttggac	aacagcgcgt	ttttaagag	8640
aaagtggaca	cgagaaccca	agaaccgaaa	gaaggcacga	agaaactaat	gaaaataaca	8700

gcagagtggc	tttggaaaga	attaggggaag	aaaaagacac	ccaggatgtg	caccagagaa	8760
gaattcacaa	gaaaggtgag	aagcaatgca	gccttggggg	ccatattcac	tgatgagaac	8820
aagtggaagt	cggcacgtga	ggctgttgaa	gatagtaggt	tttgggagct	ggttgacaag	8880
gaaaggaatc	tccatcttga	aggaaagtgt	gaaacatgtg	tgtacaacat	gatgggaaaa	8940
agagagaaga	agctagggga	attcggcaag	gcaaaaggca	gcagagccat	atggtacatg	9000
tggcttggag	cacgcttctt	agagtttgaa	gccctaggat	tcttaaata	agatcactgg	9060
ttctccagag	agaactccct	gagtggagt	gaaggagaag	ggctgcacaa	gctaggttac	9120
attctaagag	acgtgagcaa	gaaagagggg	ggagcaatgt	atgccgatga	caccgcagga	9180
tgggatacaa	gaatcacact	agaagaccta	aaaaatgaag	aaatggtaac	aaaccacatg	9240
gaaggagaac	acaagaaact	agccgaggcc	attttcaaac	taacgtacca	aaacaagggtg	9300
gtgcgtgtgc	aaagaccaac	accaagaggc	acagtaatgg	acatcatatc	gagaagagac	9360
caaagaggta	gtggacaagt	tggcacctat	ggactcaata	ctttcaccaa	tatggaagcc	9420
caactaatca	gacagatgga	gggagaagga	gtctttaaaa	gcattcagca	cctaacaatc	9480
acagaagaaa	tcgctgtgca	aaactgggta	gcaagagtgg	ggcgcgaaa	gttatcaaga	9540
atggccatca	gtggagatga	ttgtgttgtg	aaacctttag	atgacagggt	cgcaagcgct	9600
ttaacagctc	taaatgacat	gggaaagatt	aggaaagaca	tacaacaatg	ggaaccttca	9660
agaggatgga	atgattggac	acaagtggcc	ttctgttcac	accatttcca	tgagttaatc	9720
atgaaagacg	gtcgcgtact	cggtgttcca	tgtagaaacc	aagatgaact	gattggcaga	9780
gcccgaatct	cccaaggagc	aggggtgtct	ttgcggggaga	cggcctgttt	ggggaagtct	9840
tacgccccaa	tgtggagctt	gatgtacttc	cacagacgcg	acctcaggct	ggcggcaaat	9900
gctatttgct	cggcagtacc	atcacattgg	gttccaacaa	gtcgaacaac	ctggtccata	9960
catgctaaac	atgaatggat	gacaacggaa	gacatgctga	cagtctggaa	caggggtgtg	10020
attcaagaaa	acccatggat	ggaagacaaa	actccagtgg	aatcatggga	ggaaatccca	10080
tacttgggga	aaagagaaga	ccaatgggtg	ggctcattga	ttgggttaac	aagcagggcc	10140
acctgggcaa	agaacatcca	agcagcaata	aatcaagtta	gatcccttat	aggcaatgaa	10200
gaatacacag	attacatgcc	atccatgaaa	agattcagaa	gagaagagga	agaagcagga	10260
gttctgtggt	agaaagcaaa	actaacatga	aacaaggcta	gaagtcagg	cggattaagc	10320
catagtacgg	aaaaaactat	gctacctgtg	agccccgtcc	aaggacgtta	aaagaagtca	10380
ggccatcata	aatgccatag	cttgagtaaa	ctatgcagcc	tgtagctcca	cctgagaagg	10440
tgtaaaaaat	ccgggaggcc	acaaacctatg	gaagctgtac	gcatggcgta	gtggactagc	10500
ggtagagga	gacccctccc	ttacaaatcg	cagcaacaat	gggggccc	ggcgagatga	10560
agctgtagtc	tcgctggaag	gactagaggt	tagaggagac	cccccgaaa	caaaaaacag	10620
catattgacg	ctgggaaaga	ccagagatcc	tgctgtctcc	tcagcatcat	tccaggcaca	10680
gaacgccaga	aaatggaatg	gtgctgttga	atcaacaggt	tct		10723

<210> 39
 <211> 10735
 <212> DNA
 <213> Virus da Dengue

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10735)
 <223> VDV1

<400> 39
 agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag 60
 ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgata aaccaacgaa aaaagacggg 120
 tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt 180
 ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaaagga cccatgaaat tggatgagtc 240
 tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggctagatg 300
 gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtggtacgg ggtttcaaga gagaaatctc 360
 aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct 420
 gcccacagcc ctggcggttc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag 480
 caagcaggaa agaggaaagt cacttttggt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac 540
 cctcattgct atggatttgg gagagttgtg tgaggacacg atgacctaca aatgcccccg 600
 gatcactgag gcggaaccag atgacgttga ctgttggtgc aatgccacgg acacatgggt 660
 gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt 720
 ggccccacac gtggggcctt gcctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg 780
 tgcttggaac cagatacaaa aagtagagac ttgggctctg agacatccag gattcacggt 840
 gatagccctt tttctagcac atgccatagg aacatccatc acccagaaag ggatcatttt 900
 cattttgctg atgctggtaa caccatctat ggccatgcga tgcgtgggaa taggcaacag 960
 agacttcgtg gaaggactgt caggagcaac atgggtggat gtggtactgg agcatggaag 1020
 ttgcgtcacc accatggcaa aaaacaaacc aacactggac attgaactct tgaagacgga 1080
 ggtcacaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgcattgaa gctaaaatat caaacaccac 1140
 caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtggaagaac aagacgcgaa 1200
 ctttgtgtgc cgacgaacgt tcgtggacag aggtggggc aatggctgtg ggctattcgg 1260
 aaaaggtagt ctaataacgt gtgccaagtt taagtgtgtg acaaaactag aaggaaagat 1320
 agctcaatat gaaaaccta aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca 1380
 ccagggtggga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc 1440
 tacgtcggaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca ttagattgtt cacctaggac 1500
 agggctagat ttttaacgaga tgggtgtgct gacaatgaaa aagaaatcat ggcttgtcca 1560
 caaacagtgg tttctagact taccactgcc ttggacctct ggggctttta catccaaga 1620
 gacttggaac agacaagatt tactgggtcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga 1680

agtagtcgta	ctaggatcac	aagaaggagc	aatgcacact	gcgctgactg	gagcgacaga	1740
aatccaaacg	tcaggaacga	caacaatttt	cgcaggacac	ctaaaatgca	gactaaaaat	1800
ggacaaacta	acttttaaaag	ggatgtcata	tgtgatgtgc	acaggctcat	tcaagttaga	1860
gaaagaagtg	gctgagaccc	agcatggaac	tgttctggtg	caggttaaat	atgaaggaac	1920
agacgcacca	tgcaagattc	ccttttcgac	ccaagatgag	aaaggagcaa	cccagaatgg	1980
gagattaata	acagccaacc	ccatagtcac	tgacaaagaa	aaaccagtca	atattgaggc	2040
agaaccaccc	tttggtgaga	gctacatcgt	ggtaggagca	ggtgaaaaag	ctttgaaact	2100
aagctggttc	aagaaaggaa	gcagcatagg	gaaaatgttt	gaagcaactg	cccgaggagc	2160
acgaaggatg	gccatttctg	gagacaccgc	atgggacttc	ggttctatag	gaggagtgtt	2220
cacgtctatg	ggaaaactgg	tacaccaggt	ttttggaact	gcatatggag	ttttgtttag	2280
cggagtttct	tggaccatga	aaataggaat	agggattctg	ctgacatggc	taggattaaa	2340
ttcaaggaac	acgtcccttt	cggtgatgtg	catcgcagtt	ggcatggtca	cactgtacct	2400
aggagtcatg	gttcaggcag	attcgggatg	tgtaatcaac	tggaaaggca	gagaacttaa	2460
atgtggaagc	ggcatttttg	tcactaatga	agttcacact	tggacagagc	aatacaaat	2520
ccaggctgac	tcccccaaga	gactatcagc	agccattggg	aaggcatggg	aggagggtgt	2580
gtgtggaatc	cgatcagcca	ctcgtctcga	gaacatcatg	tggaaacaaa	tatcaaataga	2640
attgaaccac	atcctacttg	aaaatgacat	gaaatttaca	gtggtcgtgg	gagacgttag	2700
tggaatcttg	gccaaggaa	aaaaaatgat	taggccacaa	cccatggaac	acaaatactc	2760
gtggaaaagc	tggggaaaag	ctaaaatcat	aggagcggat	gtacagaaca	ccaccttcat	2820
catcgacggc	ccaaacaccc	cagaatgccc	tgacaatcaa	agagcatgga	atatttgggg	2880
agtagaggac	tatggatttg	ggattttcac	gacaaacata	tggttgaaat	tgcgtgactc	2940
ctacacccaa	gtatgtgacc	accggctgat	gtcagctgcc	attaaggaca	gcaaggcagt	3000
ccatgctgac	atgggggtact	ggatagaaag	tgaaaagaac	gagacatgga	agttggcgag	3060
agcctccttt	atagaagtta	agacatgcat	ctggccaaaa	tcccacactc	tatggagcaa	3120
tggagtcttg	gaaagtgaaa	tgataattcc	aaagatatat	ggaggaccaa	tatctcagca	3180
caactacaga	ccaggatatt	tcacacaaac	agcagggccg	tggcacctag	gcaagttgga	3240
actagatttc	gatttttggtg	aaggtaccac	agttgttgtg	gatgaacatt	gtggaaatcg	3300
aggaccatct	ctcagaacca	caacagtcac	aggaaagata	atccatgaat	ggtgctgcag	3360
atcttgtagc	ctaccccccc	tacgtttcaa	aggggaagac	gggtgttggt	acggcatgga	3420
aatcagacca	gtgaaggaca	aggaagagaa	cctggtcaag	tcaatggtct	ctgcagggtc	3480
aggagaagtg	gacagctttt	cactaggact	gctatgcata	tcaataatga	ttgaagaagt	3540
gatgagatcc	agatggagca	aaaaaatgct	gatgactgga	acactggctg	tgttcctcct	3600
tcttataatg	ggacaattga	catggagtga	tctgatcagg	ttatgtatta	tggttggagc	3660
caacgcttca	gacaagatgg	ggatgggaac	aacgtacct	gctttaatgg	ccactttcaa	3720

aatgagacca atgttcgccg tcgggctatt atttcgcaga ctaacatcta gagaagttct	3780
tcttcttaca attggcttga gcctggtggc atccgtggag ctaccaagtt ccctagagga	3840
gctgggggat ggacttgcaa taggcatcat gatgttgaaa ttattgactg attttcagtc	3900
acaccagcta tgggctactc tgctatcctt gacatttatt aaaacaactt tttcattgca	3960
ctatgcatgg aagacaatgg ctatggtact gtcaattgta tctctcttcc ctttatgcct	4020
gtccacgacc tctcaaaaaa caacatggct tccggtgctg ttgggatctc ttggatgcaa	4080
accactaccc atgtttctta taacagaaaa caaaatctgg ggaaggaaga gttggcccct	4140
caatgaagga attatggctg ttggaatagt tagtattcta ctaagttcac ttttaaaaaa	4200
tgatgtgccg ctagccggcc cattaatagc tggaggcatg ctaatagcat gttatgtcat	4260
atccggaagc tcagctgatt tatcactgga gaaagcggct gaggtctcct gggaggaaga	4320
agcagaacac tcaggcgctt cacacaacat actagtagag gttcaagatg atggaaccat	4380
gaagataaaa gatgaagaga gagatgacac gtcaccatt ctccttaaag caactctgct	4440
ggcagtctca ggggtgtacc caatgtcaat accagcgacc ctttttgtgt ggtatttttg	4500
gcagaaaaag aaacagagat caggagtgtc atgggacaca cccagcccc cagaagtgga	4560
aagagcagtt cttgatgatg gcacttatag aattttgcaa agaggactgt tgggcaggtc	4620
ccaagtagga gtaggagttt tccaagaagg cgtgttccac acaatgtggc acgtcactag	4680
gggagctgtc ctcatgtatc aaggaaaaag gctggaacca agctgggcca gtgtcaaaaa	4740
agacttgatc tcatatggag gaggttggag gtttcaagga tcctggaaca cgggagaaga	4800
agtacaggtg attgctgttg aaccgggaaa aaacccaaa aatgtacaaa caacgccggg	4860
taccttcaag acccctgaag gcgaagttgg agccatagcc ttagacttta aacctggcac	4920
atctggatct cccatcgtaa acagagaggg aaaaatagta ggtctttatg gaaatggagt	4980
ggtgacaaca agcggaaactt acgttagtgc catagctcaa gctaaggcat cacaagaagg	5040
gcctctacca gagattgagg acaagggtgt taggaaaaga aacttaacaa taatggacct	5100
acatccagga tcgggaaaaa caagaagata ccttcagacc atagtccgtg aggccataaa	5160
aaggaagctg cgcacgctaa tcctagctcc cacaagagtt gtcgcttctg aaatggcaga	5220
ggcactcaag ggagtgccaa taaggatatca gacaatagca gtgaagagtg aacacacagg	5280
aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cactttcacc atgcgcctcc tgtctcccgt	5340
gagagttccc aattataaca tgattatcat ggatgaagca cacttcaccg atccagccag	5400
catagcagcc agaggggtaca tctcaaccgg agtgggtatg ggtgaagcag ctgcgatctt	5460
tatgacagcc actccccag gatcggtgga ggcctttcca cagagcaatg caattatcca	5520
agatgaggaa agagacattc ctgagagatc atggaactca ggctatgact ggatcactga	5580
ttttccaggt aaaacagtct ggtttgttcc aagcatcaaa tcaggaaatg acattgccaa	5640
ctgtttaaga aaaaacggga aacgggtgat ccaattgagc agaaaaacct ttgacactga	5700
gtaccagaaa acaaaaaaca acgactggga ctatgtcgtc acaacagaca tttccgaaat	5760

gggagcaa	at	ttccgggccg	acagggta	at	agacccaagg	cggtgtctga	aaccggta	at	5820
actaaa	agat	ggtccagagc	gcgtcattct	agccggaccg	atgccagtga	ctgtggccag			5880
tgccgccc	ag	aggagaggaa	gaattggaag	gaacccaaaac	aagggaaggtg	atcagtatat			5940
ttacatgg	ga	cagcctttta	aaaatgatga	ggaccacgct	cattggacag	aagcaaagat			6000
gctccttg	ac	aatataaaca	caccagaagg	gattatccca	gccctctttg	agccggagag			6060
agaaaaga	gt	gcagctatag	acggggaata	cagactgcgg	ggtgaagcaa	ggaaaacg	tt		6120
cgtggagct	c	atgagaagag	gggatctacc	agtctggcta	tcctacaaag	ttgcctcaga			6180
aggcttcc	ag	tactccgaca	gaaggtggtg	cttcgatggg	gaaaggaaca	accaggtg	tt		6240
ggaggaga	ac	atggacgtgg	agatctggac	aaaagaagga	gaaagaaaga	aactacgacc			6300
tcgctgg	ttg	gacgccagaa	catactctga	cccactggct	ctgcgcgagt	ttaaagag	tt		6360
tgcagcag	ga	agaagaagcg	tctcaggtga	cctaata	tta	gaaataggg	aacttcaca		6420
acatttgac	g	caaagggccc	agaatgcttt	ggacaacttg	gtcatgttgc	acaattccga			6480
acaaggag	ga	aaagcctata	gacatgctat	ggaagaactg	ccagacacaa	tagaaacg	tt		6540
gatgctc	cta	gccttgatag	ctgtgttgac	tggtggag	tg	acgctgttct	tcctatcag	g	6600
aagaggtc	ta	ggaaaaacat	ctatcggctt	actctgcgtg	atggcctcaa	gcgcactg	tt		6660
atggatgg	cc	agtgtggagc	cccattggat	agcggcctcc	atcatactgg	agttctttct			6720
gatggtact	g	cttattccag	agccagacag	acagcgact	ccacaggaca	accagctagc			6780
atatgtg	gtg	ataggtctgt	tattcgtgat	attgacagtg	gcagccaatg	agatgggatt			6840
attggaa	acc	acaagaaaag	acctggggat	tggccatgta	gctgctgaaa	accaccacca			6900
tgctaca	atg	ctggacgtag	acctacatcc	agcttcagcc	tggaccctct	atgcagtggc			6960
cacaaca	atc	atcactccta	tgatgagaca	cacaattgaa	aacacaacgg	caaata	tttc		7020
cctgacag	cc	atcgcaaacc	aagcagctat	attgatggga	cttgacaagg	gatggccaat			7080
atcgaaga	tg	gacataggag	ttccacttct	cgccttgggg	tgctattccc	aagtgaatcc			7140
gctgacact	g	atagcggcag	tattgatgct	agtagctcat	tacgccataa	ttggacctg	g		7200
actgcaag	ca	aaagctacta	gagaagctca	aaaaagaaca	gcggctggaa	taatgaaaaa			7260
tccaactgt	c	gacgggattg	ttgcaataga	cttagatccc	gtggtttacg	atgcaaaatt			7320
tgaaaaac	ag	ctaggccaaa	taatgttg	gt	gatactttgc	acatcacaga	ttcttttgat		7380
gcggacta	ca	tgggccttgt	gtgaatccat	cacattggct	actggacctc	tgaccactct			7440
ttgggagg	ga	tctccaggaa	aattctggaa	caccacaata	gcggtatcca	tggcaa	acat		7500
tttcagggg	g	agttatctag	caggagcagg	tctggccttc	tcattaatga	aatctctagg			7560
aggaggtag	g	agaggcacgg	gagcccaagg	ggaaacactg	ggagaaaaat	ggaaaagaca			7620
actaaacca	a	ctgagcaagt	cagaattcaa	tacttacaag	aggagtggga	ttatggaggt			7680
ggatagat	cc	gaagccaaag	agggactgaa	aagaggagaa	acaaccaa	acgcagtatc			7740
gagagga	acg	gccaaactga	ggtggttcgt	ggagaggaac	cttgtgaaac	cagaaggga			7800

agtcata	gac	ctcgg	ttgtg	gaagag	gttg	ctgg	tcata	tattg	cgctg	ggctga	agaa	7860
agtcaca	gaa	gtgaa	aggat	acacaaa	agg	aggac	ctgga	catgag	gaac	caatcc	caat	7920
ggcgac	ctat	ggatg	gaacc	tagta	aggct	gcact	ccgga	aaagat	gtat	ttttata	acc	7980
acctga	gaaa	tgtga	caccc	ttttg	tgtga	tattg	gtgag	tcctc	tccga	accca	actat	8040
agagga	agga	agaac	gttac	gtgtt	ctgaa	aatgg	tggaa	ccatg	gctca	gaggaa	acca	8100
attttg	cata	aaaatt	tctaa	atccct	tatat	gccga	gcgtg	gtagaa	actc	tggaac	aaat	8160
gcaaaga	aaaa	catgg	aggaa	tgcta	gtgcg	aaaccc	actc	tcaaga	aaatt	ccaccc	atga	8220
aatgtac	tgg	gtttc	atgtg	gaacag	gaaa	cattg	tgtca	gcagta	aaaca	tgacat	ctag	8280
aatgtt	gcta	aatcg	gttca	caatg	gctca	cagga	agcca	acatat	gaaa	gagac	gtga	8340
cttagg	cgct	ggaaca	agac	atgtg	gcagt	agaac	cagag	gtagc	caacc	tagata	tcat	8400
tggccag	agg	atagaga	aata	taaaaa	atga	acata	agtca	acatg	gcatt	atgat	gagga	8460
caatcc	atac	aaaac	atggg	cctat	catgg	atcat	atgag	gttaag	ccat	caggat	cggc	8520
ctcatc	catg	gtcaat	ggcg	tgg	tgagatt	gtcac	caaaa	ccatg	gggatg	ttatcc	ccat	8580
ggtcaca	caa	atagc	catga	ctgata	accac	accctt	tggga	caacag	aggg	tgttta	aaaga	8640
gaaag	ttgac	acgcg	cacac	caaaag	caaaa	acgtg	gcaca	gcacaa	atta	tggaag	tgac	8700
agccag	gttg	ttatg	ggggtt	tccttt	ctag	aaacaaaa	cccaga	aat	ttt	gcaca	agaga	8760
ggag	tttaca	agaaa	agtta	ggtcaa	acgc	agctat	tggga	gcagt	gttcg	ttgat	gaaaa	8820
tcaat	ggaac	tcggc	aaaag	aagcag	tggga	agacga	acgg	ttctg	ggaac	ttgtcc	cacag	8880
agagag	gggag	cttcata	aaac	agggg	aaatg	tgccac	gtgt	gtctac	aaata	tgatg	gggga	8940
gagagaga	aaa	aaattag	gag	agttc	ggaaa	ggcaa	aaagga	agtcg	tgcaa	tatgg	tacat	9000
gtgg	ttggga	gcacg	cttcc	tagag	tttga	agccct	tgggt	ttcat	gaatg	aagat	cactg	9060
gttcag	taga	gagaatt	ccac	tcagt	ggagt	ggaag	gagaa	ggact	ccaca	aactt	ggata	9120
catact	caga	gacatat	caa	ggatt	ccagg	gggga	acatg	tatgc	agatg	acacag	cccg	9180
atggg	acaca	agaata	acag	aggat	gatct	ccaga	atgag	gctaaa	atca	ctgac	atcat	9240
ggagccc	gaa	catgc	cctgc	tggct	acgtc	aatctt	taag	ctgac	ctacc	aaaata	aggt	9300
ggtaagg	gtg	cagag	accag	caaaaa	atgg	aaccg	tgatg	gatgt	tatat	ccagac	gtga	9360
ccagag	aggc	agtgg	acagg	ttgga	actta	tggct	ttaac	acttt	cacca	acatg	gaggc	9420
ccaact	gata	agacaa	atgg	agtct	gaggg	aatctt	tttta	cccag	cgaat	tgga	acccc	9480
aaatc	tagcc	ggaag	agttc	tcgact	ggtt	ggaaaa	atat	ggtgt	cga	ggctg	aaaag	9540
aatgg	caatc	agcgg	agatg	actgt	gtggt	gaaacca	att	gatga	caggt	tcgca	acagc	9600
cttaac	agct	ttgaat	gaca	tggg	aaaagt	aagaaa	agac	atacc	acaat	ggga	accttc	9660
aaaagg	atgg	aatgat	tggc	aacaag	tgcc	tttct	gttca	caccact	tcc	accag	cta	9720
tatga	aggat	gggag	gggaga	tagtg	gtgcc	atgcc	gcaac	caagat	gaac	ttgtg	ggggag	9780
ggccag	agta	tcaca	aggcg	ccggat	ggag	cctga	gagaa	accgc	atgcc	tagg	caagtc	9840

```

atatgcacaa atgtggcagc tgatgtatTT ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900
cgctatttTgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960
ccatgccccat caccaatgga tgacaacaga agacatgtta tcagtatgga atagggTctg 10020
gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagttcc 10080
atacctagga aagagggaa atcagtggtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140
cacctggggc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200
gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagtg atcccgaagg 10260
ggcactctgg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aaatgaggca 10320
agaagtcagg ccagattaag ccatagtacg gtaagagcta tgctgcctgt gagccccgtc 10380
caaggacgta aaatgaagtc aggccgaaag ccacggtttg agcaagccgt gctgcctgtg 10440
gctccatcgt ggggatgtaa aaacccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500
ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560
acaccagggg aagctgtacc ctggtggtaa ggactagagg ttagaggaga cccccgcgt 10620
aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcatc 10680
attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tggTgctgtt gaatcaacag gttct 10735

```

```

<210> 40
<211> 10735
<212> DNA
<213> Vírus da Dengue

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10735)
<223> LAV1/PDK13

```

```

<400> 40
agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag 60
ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgatc aaccaacgaa aaaagacggg 120
tcgaccgtct ttcaaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg ttTcacagtt 180
ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaaagga cccatgaaat tggTgatggc 240
tttcatagca ttcttaagat ttctagccat acccccaaca gcaggaattt tggctagatg 300
gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg ggTttcaaga gagaaatctc 360
aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct 420
gccacagcc ctggcgTtcc atctgacgac acgagggggg gagccgcata tgatagttag 480
caagcaggaa agaggaaagt cacttttTgt caagacctct gcaggTgtca acatgtgcac 540
cctcattTcg atggattTgg gagagtTgtg tgaggacacg atgacctaca aatgcccccg 600
gatcactgag gcggaaccag atgacgtTga ctgtTggtgc aatgccacgg acacatgggt 660
gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt 720

```

ggccccacac gtggggcttg gcctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg	780
tgcttgaaa cagatacaaa aagtagagac ttgggctctg agacatccag gattcacggt	840
gatagccctt tttctagcac atgccatagg aacatccatc acccagaaag ggatcatttt	900
cattttgctg atgctggtaa caccatctat ggccatgcga tgcgtgggaa taggcaacag	960
agacttcgtg gaaggactgt caggagcaac atgggtggat gtggtactgg agcatggaag	1020
ttgcgtcacc accatggcaa aaaacaaacc aacactggac attgaactct tgaagacgga	1080
ggtcacaaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgcattgaa gctaaaatat caaacaccac	1140
caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtggaagaac aagacgcgaa	1200
ctttgtgtgc cgacgaacgt tcgtggacag aggctggggc aatggctgtg ggctattcgg	1260
aaaaggtagt ctaataacgt gtgccaagtt taagtgtgtg aaaaaactag aaggaaagat	1320
agctcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca	1380
ccagggtgga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc	1440
tacgtcggaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca ttagattgtt cacctaggac	1500
agggctagat tttaacgaga tgggtgtgtg gacaatgaaa aagaaatcat ggcttgtcca	1560
caaacagtgg tttctagact taccactgcc ttggacctct ggggctttaa catcccaaga	1620
gacttggaa agacaagatt tactggtcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga	1680
agtagtcgta ctaggatcac aagaaggagc aatgcacact gcgctgactg gagcgacaga	1740
aatccaaacg tcaggaacga caacaatttt cgcaggacac ctaaaatgca gactaaaaat	1800
ggacaaacta actttaaaag ggatgtcata tgtgatgtgc acaggctcat tcaagttaga	1860
gaaagaagtg gctgagaccc agcatggaac tgttctggtg caggttaaat atgaaggaa	1920
agacgcacca tgcaagattc ctttttcgac ccaagatgag aaaggagcaa ccagaaatgg	1980
gagattaata acagccaacc ccatagtcac tgacaaagaa aaaccagtca atattgaggc	2040
agaaccaccc tttggtgaga gctacatcgt ggtaggagca ggtgaaaaag ctttgaaact	2100
aagctgggtc aagaaaggaa gcagcatagg gaaaatgttt gaagcaactg cccgaggagc	2160
acgaaggatg gccattctgg gagacaccgc atgggacttc ggttctatag gaggagtgtt	2220
cacgtctatg ggaaaactgg tacaccaggt ttttggaaact gcatatggag ttttgtttag	2280
cggagtcttct tggaccatga aaataggaat agggattctg ctgacatggc taggattaaa	2340
ttcaaggaa acgtcccttt cggatgatgtg catcgagtt ggcattggtca cactgtacct	2400
aggagtcatg gttcaggcag attcgggatg tgtaatcaac tggaaaggca gagaacttaa	2460
atgtggaagc ggcatttttg tctaataatga agttcacact tggacagagc aatacaaatt	2520
ccaggctgac tcccccaaga gactatcagc agccattggg aaggcatggg aggaggggtg	2580
gtgtggaatc cgatcagcca ctcgtctcga gaacatcatg tggaaacaaa tatcaaatga	2640
attgaaccac atcctacttg aaaatgacat gaaatttaca gtggtcgtgg gagacgttag	2700
tggaatcttg gcccaaggga aaaaaatgat taggccacaa cccatggaac acaaatactc	2760

gtggaaaagc	tggggaaaag	ctaaaatcat	aggagcggat	gtacagaaca	ccaccttcat	2820
catcgacggc	ccaaacaccc	cagaatgccc	tgacaatcaa	agagcatgga	atatttgga	2880
agtagaggac	tatggatttg	ggattttcac	gacaaacata	tggttgaaat	tgcgtagactc	2940
ctacacccaa	gtatgtgacc	accggctgat	gtcagctgcc	attaaggaca	gcaaggcagt	3000
ccatgctgac	atgggttact	ggatagaaag	tgaaaagaac	gagacatgga	agttggcgag	3060
agcctccttt	atagaagtta	agacatgcat	ctggccaaaa	tcccacactc	tatggagcaa	3120
tggagttctg	gaaagtgaaa	tgataattcc	aaagatatat	ggaggaccaa	tatctcagca	3180
caactacaga	ccaggatatt	tcacacaaac	agcagggccg	tggcacctag	gcaagttgga	3240
actagatttc	gatttttgtg	aaggtaccac	agttgttgtg	gatgaacatt	gtggaaatcg	3300
aggaccatct	ctcagaacca	caacagtcac	aggaaagata	atccatgaat	ggtgctgcag	3360
atcttgtacg	ctaccccccc	tacgtttcaa	aggggaagac	gggtgttggg	acggcatgga	3420
aatcagacca	gtgaaggaca	aggaagagaa	cctggtcaag	tcaatggtct	ctgcaggggc	3480
aggagaagtg	gacagctttt	cactaggact	gctatgcata	tcaataatga	ttgaagaagt	3540
gatgagatcc	agatggagca	aaaaaatgct	gatgactgga	acactggctg	tgttcctcct	3600
tcttataatg	ggacaattga	catggagtga	tctgatcagg	ttatgtatta	tggttgagc	3660
caacgcttca	gacaagatgg	ggatgggaac	aacgtacctt	gctttaatgg	ccactttcaa	3720
aatgagacca	atgttcgccg	tcgggctatt	atttcgcaga	ctaactcta	gagaagttct	3780
tcttcttaca	attggcttga	gcctggtggc	atccgtggag	ctaccaagtt	ccctagagga	3840
gctgggggat	ggacttgcaa	taggcacat	gatgttgaaa	ttattgactg	attttcagtc	3900
acaccagcta	tgggtacttc	tgctatcctt	gacatttatt	aaaacaactt	tttcattgca	3960
ctatgcatgg	aagacaatgg	ctatggtact	gtcaattgta	tctctcttcc	ctttatgcct	4020
gtccacgacc	tctcaaaaaa	caacatggct	tccggtgctg	ttgggatctc	ttggatgcaa	4080
accactaccc	atgtttctta	taacagaaaa	caaaatctgg	ggaaggaaga	gttggcccct	4140
caatgaagga	attatggctg	ttggaatagt	tagtattcta	ctaagttcac	ttttaaaaaa	4200
tgatgtgccg	ctagccggcc	cattaatagc	tggaggcatg	ctaatagc	gttatgtcat	4260
atccggaagc	tcagctgatt	tatcactgga	gaaagcggct	gaggtctcct	gggaggaaga	4320
agcagaacac	tcaggcgctt	cacacaacat	actagtagag	gttcaagatg	atggaaccat	4380
gaagataaaa	gatgaagaga	gagatgacac	gctcaccatt	ctccttaaag	caactctgct	4440
ggcagtctca	ggggtgtacc	caatgtcaat	accagcgacc	ctttttgtgt	ggtatttttg	4500
gcagaaaaag	aaacagagat	caggagtgtc	atgggacaca	cccagccccc	cagaagtgga	4560
aagagcagtt	cttgatgatg	gcatctatag	aattttgcaa	agaggactgt	tgggcaggtc	4620
ccaagtagga	gtaggagttt	tccaagaagg	cgtgttccac	acaatgtggc	acgtcactag	4680
gggagctgtc	ctcatgtatc	aaggaaaaag	gctggaacca	agctgggcca	gtgtcaaaaa	4740
agacttgatc	tcatatggag	gaggttgag	gtttcaagga	tcctggaaca	cgggagaaga	4800

agtacaggtg attgctgttg aaccgggaaa aaaccccaaa aatgtacaaa caacgccggg	4860
taccttcaag acccctgaag gcgaagttgg agccatagcc ttagacttta aacctggcac	4920
atctggatct cccatcgtaa acagagaggg aaaaatagta ggtctttatg gaaatggagt	4980
ggtgacaaca agcgggaactt acgttagtgc catagctcaa gctaaggcat cacaagaagg	5040
gcctctacca gagattgagg acaaggtggt taggaaaaga aacttaacaa taatggacct	5100
acatccagga tcgggaaaaa caagaagata ccttccagcc atagtccgtg aggccataaa	5160
aaggaagctg cgacgcgtta tcctagctcc cacaagagtt gtcgcttctg aaatggcaga	5220
ggcactcaag ggagtgccaa taaggatatca gacaacagca gtgaagagtg aacacacagg	5280
aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cactttcacc atgcgcctcc tgtctcccgt	5340
gagagttccc aattataaca tgattatcat ggatgaagca cacttcaccg atccagccag	5400
catagcagcc agaggggtaca tctcaacccg agtgggtatg ggtgaagcag ctgcgatctt	5460
tatgacagcc actccccag gatcgggtgga ggcctttcca cagagcaatg caattatcca	5520
agatgaggaa agagacattc ctgagagatc atggaactca ggctatgact ggatcactga	5580
ttttccaggt aaaacagtct ggtttgttcc aagcatcaaa tcaggaaatg acattgccaa	5640
ctgtttaaga aaaaacggga aacgggtgat ccaattgagc agaaaaacct ttgacactga	5700
gtaccagaaa acaaaaaaca acgactggga ctatgtcgtc acaacagaca tttccgaaat	5760
gggagcaaat ttccgggccg acagggtaat agacccaagg cgggtgtctga aaccggtaat	5820
actaaaagat ggtccagagc gcgtcattct agccggaccg atgccagtga ctgtggccag	5880
tgccgcccag aggagaggaa gaattggaag gaaccaaac aaggaagggtg atcagtatat	5940
ttacatggga cagcctttaa acaatgatga ggaccacgct cattggacag aagcaaagat	6000
gctccttgac aatataaaca caccagaagg gattatcca gccctctttg agccggagag	6060
agaaaagagt gcagctatag acggggaata cagactgcgg ggtgaagcaa ggaaaacgtt	6120
cgtggagctc atgagaagag gggatctacc agtctggcta tcctacaaag ttgcctcaga	6180
aggcttccag tactccgaca gaagggtgtg cttcgatggg gaaaggaaca accaggtgtt	6240
ggaggagaac atggacgtgg agatctggac aaaagaagga gaaagaaaga aactacgacc	6300
tcgtgggttg gacgccagaa catactctga cccactggct ctgcgcgagt ttaaagagtt	6360
tgcagcagga agaagaagcg tctcaggtga cctaataatta gaaataggga aacttccaca	6420
acatttgacg caaagggccc agaatgcttt ggacaacttg gtcattgtgc acaattccga	6480
acaaggagga aaagcctata gacatgctat ggaagaactg ccagacacaa tagaaacgtt	6540
gatgctccta gccttgatag ctgtgttgac tgggtggagt acgctgttct tcctatcagg	6600
aagaggtcta ggaaaaacat ctatcggtt actctgcgtg atggcctcaa gcgcactgtt	6660
atggatggcc agtgtggagc cccattggat agcggcctcc atcatactgg agttctttct	6720
gatgggtactg cttattccag agccagacag acagcgact ccacaggaca accagctagc	6780
atatgtggtg ataggtctgt tattcgtgat attgacagtg gcagccaatg agatgggatt	6840

attggaacc	acaaagaaag	acctggggat	tggccatgta	gctgctgaaa	accaccacca	6900
tgctacaatg	ctggacgtag	acctacatcc	agcttcagcc	tggaccctct	atgcagtggc	6960
cacaacaatc	atcactccta	tgatgagaca	cacaattgaa	aacacaacgg	caaatatttc	7020
cctgacagcc	atcgcaaacc	aagcagctat	attgatggga	cttgacaagg	gatggccaat	7080
atcgaagatg	gacataggag	ttccacttct	cgccttgggg	tgctattccc	aagtgaatcc	7140
gctgacactg	atagcggcag	tattgatgct	agtagctcat	tacgccataa	ttggacctgg	7200
actgcaagca	aaagctacta	gagaagctca	aaaaagaaca	gcggctggaa	taatgaaaaa	7260
tccaactgtc	gacgggattg	ttgcaataga	cttagatccc	gtggttttacg	atgcaaaatt	7320
tgaaaaacag	ctaggccaaa	taatgtttgt	gatactttgc	acatcacaga	ttcttttgat	7380
gcggactaca	tgggccttgt	gtgaatccat	cacattggct	actggacctc	tgacctctct	7440
ttgggagggg	tctccaggaa	aattctggaa	caccacaata	gcggtatcca	tggcaaacat	7500
tttcaggggg	agttatctag	caggagcagg	tctggccttc	tcattaatga	aatctctagg	7560
aggaggtagg	agaggcacgg	gagcccaagg	ggaaactctg	ggagaaaaat	ggaaaagaca	7620
actaaaccaa	ctgagcaagt	cagaattcaa	tacttacaag	aggagtggga	ttatggagggt	7680
ggatagatcc	gaagccaaaag	agggactgaa	aagaggagaa	acaaccaaac	acgcagtatc	7740
gagaggaacg	gccaaactga	ggtggttcgt	ggagaggaac	cttgtgaaac	cagaagggaa	7800
agtcatagac	ctcggttgtg	gaagaggtgg	ctggtcatat	tattgctgctg	ggctgaagaa	7860
agtcacagaa	gtgaaaggat	acacaaaagg	aggacctgga	catgaggaac	caatcccaat	7920
ggcgacctat	ggatggaacc	tagtaaagct	gcactccgga	aaagatgtat	tttttatacc	7980
acctgagaaa	tgtgacaccc	ttttgtgtga	tattggtgag	tcctctccga	acccaactat	8040
agaggaagga	agaacgttac	gtgttctgaa	aatggtggaa	ccatggctca	gaggaaacca	8100
atthttgcata	aaaattctaa	atccctatat	gccgagcgtg	gtagaaactc	tggaaacaaat	8160
gcaaagaaaa	catggaggaa	tgctagtgcg	aaaccctctc	tcaagaaatt	ccacccatga	8220
aatgtactgg	gtttcatgtg	gaacaggaaa	cattgtgtca	gcagtaaaca	tgacatctag	8280
aatgtttgcta	aatcggttca	caatggctca	caggaagcca	acatatgaaa	gagacgtgga	8340
cttaggcgct	ggaacaagac	atgtggcagt	agaaccagag	gtagccaacc	tagatatcat	8400
tggccagagg	atagagaata	taaaaaatga	acataagtca	acatggcatt	atgatgagga	8460
caatccatac	aaaacatggg	cctatcatgg	atcatatgag	gttaagccat	caggatcggc	8520
ctcatccatg	gtcaatggcg	tggtagagatt	gctcaccaaa	ccatgggatg	ttatccccat	8580
ggtcacacaa	atagccatga	ctgataccac	accctttgga	caacagaggg	tgtttaaaga	8640
gaaagtgtgac	acgcgcacac	caaaagcaaa	acgtggcaca	gcacaaatta	tggaaagtgtgac	8700
agccaggtgg	ttatgggggtt	tccttttctag	aaacaaaaaa	cccagaattt	gcacaagaga	8760
ggagtthtaca	agaaaagtta	ggtcaaacgc	agctatttga	gcagtgttcg	ttgatgaaaa	8820
tcaatggaac	tcggcaaaaag	aagcagtggg	agacgaacgg	ttctgggaac	ttgtccacag	8880

agagagggag cttcataaac aggggaaatg tgccacgtgt gtctacaata tgatggggaa 8940
 gagagagaaa aaattaggag agttcggaaa ggcaaaagga agtcgtgcaa tatggtacat 9000
 gtggttggga gcacgcttcc tagagtttga agcccttggt ttcattgaatg aagatcactg 9060
 gttcagtaga gagaattcac tcagtggagt ggaaggagaa ggactccaca aacttgata 9120
 catactcaga gacatatcaa ggattccagg ggggaacatg tatgcagatg acacagccgg 9180
 atgggacaca agaataacag aggatgatct ccagaatgag gctaaaatca ctgacatcat 9240
 ggagcccgaa catgccctgc tggctacgtc aatctttaag ctgacctacc aaaataaggt 9300
 ggtaaggggtg cagagaccag caaaaaatgg aaccgtgatg gatgttatat ccagacgtga 9360
 ccagagaggc agtggacagg ttggaactta tggcttaaac actttcacca acatggaggc 9420
 ccaactgata agacaaatgg agtctgaggg aatcttttta cccagcgaat tggaaacccc 9480
 aaatctagcc ggaagagttc tcgactggtt ggaaaaatat ggtgtcgaaa ggtgaaaag 9540
 aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc 9600
 cttacagct ttgaatgaca tgggaaaagt aagaaaagac ataccacaat gggaaccttc 9660
 aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgcc tttctgttca caccatttc accagctaata 9720
 tatgaaggat gggagggaga tagtggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag 9780
 ggccagagta tcacaaggcg ccgatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840
 atatgcacaa atgtggcagc tgatgtattt ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900
 cgctatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960
 ccatgcccac caccaatgga tgacaacaga agacatgtta tcagtatgga atagggctctg 10020
 gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagttcc 10080
 atacctagga aagaggggag atcagtgggtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140
 cacctgggccc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200
 gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagtg atcccgaagg 10260
 ggactcttgg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aaatgaggca 10320
 agaagtcagg ccagattaag ccatagtacg gtaagagcta tgctgcctgt gagccccgtc 10380
 caaggacgta aaatgaagtc aggccgaaag ccacggtttg agcaagccgt gctgcctgtg 10440
 gctccatcgt ggggatgtaa aaaccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500
 ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560
 acaccagggg aagctgtacc ctggtggtaa ggactagagg ttagaggaga cccccgcgt 10620
 aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcatc 10680
 attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tgggtgctgtt gaatcaacag gttct 10735

<210> 41
 <211> 10699
 <212> DNA
 <213> Vírus da Dengue

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10699)
 <223> LAV3

<400> 41
 agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgact cggaagcttg cttaacgtag 60
 tgctgacagt tttttattag agagcagatc tctgatgaac aaccaacgga aaaagacggg 120
 aaaaccgtct atcaatatgc tgaaacgcgt gagaaaccgt gtgtcaactg gatcacagtt 180
 ggcgaagaga ttctcaagag gattgctgaa cggccaagga ccaatgaaat tggttatggc 240
 atttatagct ttcttcagat ttctagccat tccaccgaca gcaggagtct tggctagatg 300
 ggggtacctt aagaagtcgg gggctattaa ggtcttaaaa ggcttcaaga aggagatctc 360
 aaacatgctg agcattatca acaaacggaa aaagacatcg ctctgtctca tgatgatgtt 420
 accagcaaca cttgctttcc acttaacttc acgagatgga gagccgcgca tgattgtggg 480
 gaagaatgaa agaggaaaat ccctactttt caagacagcc tctggaatca acatgtgcac 540
 actcatagct atggatctgg gagagatgtg tgatgacacg gtcacttaca aatgccccca 600
 cattaccgaa gtggagcctg aagacattga ctgctggtgc aaccttacat cgacatgggt 660
 gacttatgga acatgcaatc aagctggaga gcatagacgc gataagagat cagtggcggt 720
 agctcccat gttggcatgg gactggacac acgcactcaa acctggatgt cggctgaagg 780
 agcttgagga caagtcgaga aggtagagac atggggccctt aggcacccag ggtttaccat 840
 actagcccta tttcttgccc attacatagg cacttccttg acccagaaag tggttatttt 900
 tatactatta atgctggtta ccccatccat gacaatgaga tgtgtaggag taggaaacag 960
 agattttgtg gaaggcctat cgggagctac gtgggttgac gtggtgctcg agcacggtgg 1020
 gtgtgtgact accatggcta agaacaagcc cacgctggac atagagcttc agaagaccga 1080
 ggccacccaa ctggcgaccc taaggaaagt atgcattgag ggaaaaatta ccaacataac 1140
 aaccgactca agatgtccca cccaagggga agcgatttta cctgaggagc aggaccagaa 1200
 ctacgtgtgt aagcatacat acgtggacag aggcctgggga aacggttggt gtttgtttgg 1260
 caagggaagc ttggtgacat gcgcgaaatt tcaatgttta gaatcaatag agggaaaagt 1320
 ggtgcaacat gagaacctca aatacacctg catcatcaca gtgcacacag gagaccaaca 1380
 ccagggtggga aatgaaacgc agggagtcac ggctgagata acaccccgag catcaaccgc 1440
 tgaagccatt ttacctgaat atggaaccct cgggctagaa tgctcaccac ggacagggtt 1500
 ggatttcaat gaaatgatct yattgacaat gaagaacaaa gcatggatgg tacatagaca 1560
 atggttcttt gacttacctt taccatggac atcaggagct acagcagaaa caccaacttg 1620
 gaacaggaaa gagcttcttg tgacatttaa aaatgcacat gcaaaaaagc aagaagtagt 1680
 tgttcttgga tcacaagagg gagcaatgca tacagcactg acaggagcta cagagatcca 1740
 aacctcagga ggcacaagta tctttgcggg gcacttaaaa tgtagactca agatggacaa 1800
 attggaactc aaagggatga gctatgcaat gtgcttgggt agctttgtgt tgaagaaaga 1860

agtctccgaa	acgcagcatg	ggacaatact	cattaagggtt	gagtacaaaag	ggaaagatgc	1920
accctgcaag	attcctttct	ccacggagga	tggacaagga	aaagctcaca	atggcagact	1980
gatacacagcc	aatccagtgg	tgaccaagaa	ggaggagcct	gtcaacattg	aggctgaacc	2040
tcctttttgga	gaaagtaaca	tagtaattgg	aattggagac	aaagccctga	aaatcaactg	2100
gtacaagaag	ggaagctcga	ttgggaagat	gttcgaggct	actgccagag	gtgcaaggcg	2160
catggccatc	ttgggagaca	cagcctggga	ctttggatca	gtgggtggtg	ttttgaattc	2220
attagggaaa	atggtccacc	aaatatttgg	gagtgttac	acagccctat	ttggtggagt	2280
ctcctggatg	atgaaaattg	gaatagggtg	cctcttaacc	tggatagggt	tgaactcaaa	2340
aaatacttct	atgtcatttt	catgcatcgc	gataggaatc	attacactct	atctgggagc	2400
cgtggtgcaa	gctgacatgg	ggtgtgtcat	aaactggaaa	ggcaaagaac	tcaaatgtgg	2460
aagtggaatt	ttcgtcacta	atgagggtcca	cacctggaca	gagcaataca	aatttcaagc	2520
agactcccc	aagagactgg	caacagccat	tgcaggcgct	tgggaaaatg	gagtgtgcgg	2580
aattagggtca	acaaccagaa	tggagaacct	cttgtggaag	caaatagcca	atgaactgaa	2640
ttacatatata	tgggaaaaca	acattaaatt	aacggtagtt	gtaggcgaca	taactggggt	2700
cttagagcaa	gggaaaagaa	cactaacacc	acaacccatg	gagctaaaat	attcttggaa	2760
aacatgggga	aaggcaaaaa	tagtgacagc	tgaacacaaa	aattcctctt	tcataataga	2820
tgggccaagc	acaccggagt	gtccaagtgc	ctcaagagca	tggaatgtgt	gggagggtgga	2880
ggattacggg	ttcggagttt	tcacaaccaa	catatggctg	aaactccgag	aggtgtacac	2940
ccaactatgt	gaccataggc	taatgtcggc	agccgtcaag	gatgagaggg	ctgtacatgc	3000
cgacatgggc	tattggatag	aaagccaaaa	gaatgggagt	tggaagctag	aaaaagcatc	3060
cttcatagag	gtgaaaacct	gcacatggcc	aaaatcacac	actctctgga	gcaatggtgt	3120
gctagagagt	gacatgatta	tcccaaagag	tctagctggt	cccatttcgc	aacacaacca	3180
caggcccggg	taccacaccc	aaacggcagg	accctggcac	ttaggaaaat	tggagctgga	3240
cttcaactat	tgtgaaggaa	caacagttgt	catctcagaa	aactgtggga	caagaggccc	3300
atcattgaga	acaacaacgg	tgtcagggaa	gttgatacac	gaatggtgct	gccgctcgtg	3360
cacacttcct	cccctacgat	acatgggaga	agacggctgc	tggatatggca	tggaaatcag	3420
accattaat	gagaaagaag	agaatatggt	aaagtctcta	gcctcagcag	ggagtggaaa	3480
ggtggacaac	ttcacaatgg	gtgtcttgtg	tttggcaatc	ctctttgaag	aggtgatgag	3540
aggaaaattt	gggaaaaaac	acatgattgc	aggggttctc	ttcacgtttg	tgctcctcct	3600
ctcagggcaa	ataacatgga	gagacatggc	gcacacactc	ataatgattg	ggtccaacgc	3660
ctctgacaga	atggggatgg	gcgtcactta	cctagctcta	attgcaacat	ttaaaattca	3720
gccactcctg	gctttgggat	tcttcctgag	gaaactgaca	tctagagaaa	atttattgct	3780
gggagttggg	ttggccatgg	cagcaacgtt	acgactgcc	gaggacattg	aacagatggc	3840
gaatggaatt	gctttggggc	tcatggctct	taaactgata	acacaatttg	aaacatacca	3900

actatggacg	gcattagttt	ccctaacgtg	ttcaaataca	attttcacgt	tgactgttgc	3960
ctggagaaca	gccactctga	ttttagccgg	aatttcgctt	ttgccagtgt	gccagtcttc	4020
gagcatgagg	aaaacagatt	ggctcccaat	gactgtggca	gctatgggag	ctcaaccct	4080
accacttttt	attttcagtc	tgaaagatac	actcaaaagg	agaagctggc	cactgaatga	4140
gggggtgatg	gcagttggac	ttgtgagcat	tctagctagt	tctctcctta	ggaatgatgt	4200
gcctatggct	ggaccattag	tggctggggg	cttgctgata	gcgtgctacg	tcataactgg	4260
cacgtcagca	gacctcactg	tagaaaaagc	agcagatgta	acatgggagg	aagaggccga	4320
gcaaacagga	gtgtcccaca	atttaatggt	cacagttgat	gatgatggaa	caatgagaat	4380
aaaagatgac	gagactgaga	acatcttaac	agtgtcttta	aaaacagcac	tactaatagt	4440
atcaggcatc	tttccatact	ccatacccg	aacactgttg	gtctggcata	cttggcaaaa	4500
gcaaacccaa	agatccggcg	tcctatggga	cgtaccacgc	ccccagaga	cacagaaagc	4560
ggaactggaa	gaaggggtct	ataggatcaa	acagcaagga	atttttggga	aaaccacaagt	4620
gggggttggg	gtacagaaag	aaggagtttt	ccacaccatg	tggcatgtca	caagaggggc	4680
agtgttgaca	cacaatggga	aaagactgga	accaaactgg	gctagcgtga	aaaaagatct	4740
gatttcatac	ggaggaggat	ggagattgag	tgcacaatgg	aaaaaggggg	aggaggtgca	4800
ggttattgcc	gtagagcctg	ggaagaaccc	aaagaacttt	caaaccatgc	caggcatttt	4860
tcagacaaca	acaggggaaa	taggagcaat	tgacttggat	ttcaagcctg	gaacttcagg	4920
atctcccatc	ataaacagag	agggaaggt	agtgggactg	tatggcaatg	gagtgggttac	4980
aaagaatgga	ggctatgtca	gtggaatagc	gcaaacaaat	gcagaaccag	atggaccgac	5040
accagagttg	gaagaagaga	tgttcaaaaa	gcgaaatcta	accataatgg	atctccatcc	5100
tgggtcagga	aagacgcgga	aatatcttcc	agctattggt	agagaggcaa	tcaagagacg	5160
cttaaggact	ctaatttttg	caccaacaag	ggtagttgca	gctgagatgg	aagaagcatt	5220
gaaagggctc	ccaataaggt	atcaaacaac	tgcaacaaaa	tctgaacaca	caggaagaga	5280
gattgttgat	ctaattgtgtc	acgcaacggt	cacaatgcgc	ttgctgtcac	cagtcagggt	5340
tccaaactac	aacttgataa	taatggatga	ggcccatttc	acagaccag	ccagtatagc	5400
ggctagaggg	tacatatcaa	ctcgtgtagg	aatgggagag	gcagccgcaa	ttttcatgac	5460
agcaacaccc	cctggaacag	ctgatgcctt	tcctcagagc	aacgctccaa	ttcaagatga	5520
agagagagac	ataccggaac	gctcatggaa	ttcaggcaat	gaatggatta	ctgactttgt	5580
tgggaagaca	gtgtggtttg	tccttagcat	caaagccgga	aatgacatag	caaactgctt	5640
gcggaaaaat	ggaaaaaagg	ttattcaact	cagcaggaag	acctttgaca	cagaatatca	5700
aaagacccaa	ctgaatgatt	gggactttgt	ggtgacaaca	gacatttcag	aaatgggagc	5760
caatttcaaa	gcagatagag	tgatcgaccc	aagaagatgt	ctcaagccgg	tgattttgac	5820
agatggaccc	gagcgggtga	tcctggctgg	accaatgcc	gtcaccgtag	cgagcgctgc	5880
gcaaaggaga	gggagagttg	gcaggaaccc	acaaaaagaa	aatgaccagt	acatattcat	5940

gggccagcct	ctcaacaatg	atgaagacca	tgctcactgg	acagaagcaa	aatgctgct	6000
ggacaacatc	aacacaccag	aagggattat	accagctctc	tttgaaccag	aaagggagaa	6060
gtcagccgcc	atagacggcg	aataccgcct	gaaggggtgag	tccaggaaga	ctttcgtgga	6120
actcatgagg	aggggtgacc	tcccagtttg	gctagcccat	aaagtagcat	cagaagggat	6180
caaatataca	gatagaaaat	ggtgctttga	tggagaacgt	aataatcaaa	ttttagagga	6240
gaatatggat	gtggaaatct	ggacaaagga	aggagaaaag	aaaaaactga	gacctaggtg	6300
gcttgatgcc	cgcacttatt	cagatccttt	agcactcaaa	gaattcaagg	attttgcagc	6360
tggcagaaaag	tcaatcgccc	ttgatcttgt	gacagaaata	ggaagagtgc	cttcacactt	6420
agcccacaga	acgagaaacg	ccctggataa	tttggtgatg	ctgcacacgt	cagaacatgg	6480
cggtagggcc	tacaggcatg	cagtggagga	actaccagaa	acgatggaaa	cactcttact	6540
cctgggactg	atgatcttgt	taacaggtgg	agcaatgctc	ttcttgatat	caggtaaagg	6600
gattggaaaag	acttcaatag	gactcatttg	tgtaattgct	tccagcggca	tgttatggat	6660
ggctgatgtc	ccactccaat	ggatcgcac	ggctatagtc	ctggagtttt	ttatgatggt	6720
gttgctcata	ccagaaccag	aaaagcagag	aactccccaa	gacaaccaac	tcgcatatgt	6780
cgtgataggc	atacttacat	tggctgcaat	agtagcggcc	aatgaaatgg	gactgtttgga	6840
aactacaaag	agagatttag	gaatgtctaa	agaaccaggt	gttgtttctc	caaccagcta	6900
tttggatgtg	gacttgcacc	cagcatcagc	ctggacattg	tacgccgtgg	ccacaacagt	6960
aataacacca	atgttgagac	acaccataga	gaattccaca	gcaaattgtg	ctctggcagc	7020
catagctaac	caggcagtgg	tcctgatggg	tttagacaaa	ggatggccga	tatcgaaaat	7080
ggacttgggc	gtaccactat	tggcactggg	ttgctattca	caagtgaacc	cactaactct	7140
tgacgcggca	gtacttttgc	tagtcacaca	ttatgcaatt	ataggtccag	gattgcaggc	7200
aaaagccacc	cgtgaagctc	agaaaaggac	agctgctgga	ataatgaaga	atccaacggt	7260
ggatggaata	atgacaatag	acctagatcc	tgtaatatat	gattcaaaat	ttgaaaagca	7320
actaggacag	gtcatgctcc	tggttctgtg	tgcagtccaa	cttttattga	tgagaacatc	7380
atgggccttg	tgtgaagtgc	taaccctagc	cacaggacca	ataacaacac	tctgggaagg	7440
atcacctggg	aagttctgga	acaccacgat	agctgtttcc	atggcgaaca	tctttagagg	7500
gagctattta	gcaggagctg	ggcttgcttt	ttctatcatg	aatcagttg	gaacaggaaa	7560
gagaggaaca	gggtcacaag	gtgaaacctt	aggagaaaag	tggaataaga	aattaaatca	7620
gttatccccg	aaagagtttg	acctttacaa	gaaatccgga	atcaccgaag	tggatagaac	7680
agaagccaaa	gaagggttaa	aaagaggaga	aataacacac	catgccgtgt	ccagaggcag	7740
cgcaaaactt	caatggttcg	tggagagaaa	catggtcatt	cctgaaggaa	gagtcataga	7800
cctaggctgt	ggaagaggag	gctggtcata	ttactgtgca	ggactgaaaa	aagttacaga	7860
agtgcgagga	tacacaaaag	gcggcccagg	acacgaagaa	ccagtaccta	tgtctacata	7920
cggatggaac	atagtcaagt	taatgagtgg	aaaggatggt	ttttatctgc	cacctgaaaa	7980

gtgtgatacc ctattgtgtg acattggaga atcttcacca agcccaacag tggaagaaag	8040
cagaaccata agagttttga agatgggttga accatggcta aagaacaacc agttttgcat	8100
taaagtattg aaccataca tgccaactgt gattgagcac ttagaaagac tacaaggaa	8160
acatggagga atgcttgtga gaaatccact ctcacgaaac tccacgcacg aaatgtattg	8220
gatatccaat ggtacaggca atatcgtctc ttcagtcaac atggtatcca gattgctact	8280
gaacagattc acaatgacac acaggagacc caccatagag aaagatgtgg atctaggagc	8340
aggaacccga catgtcaatg cggaaccaga aacacccaac atggatgtca ttggggaaag	8400
aataaaaagg atcaaagagg agcatagtcc aacatggcac tatgatgatg aaaatcctta	8460
caaacgtgg gcttaccatg gatcctatga agtaaaagcc acaggctcag cctcctccat	8520
gataaatgga gtcgtgaaac tcctcacaaa accatgggat gtggtgcca tggtgacaca	8580
gatggcaatg acagatacaa ctccattcgg ccagcaaaga gtttttaaag agaaagtga	8640
caccaggaca cctaggcca tgccaggaa aagaaagggt atggagatca cagcggagt	8700
gctttggagg accctgggaa ggaacaaaag acccagatta tgcacaaggg aggaattcac	8760
aaagaaggtc agaaccaacg cagctatggg cgctgtcttc acagaagaga accaatggga	8820
cagtgcgaga gctgctgttg aggacgaaga attttgaaa cttgtggaca gagaacgtga	8880
actccacaaa ctgggcaagt gtggaagctg cgtttacaac atgatgggca agagagagaa	8940
aaaacttga gagtttggtg aagcaaaagg cagtagggct atatggtaca tgtggttggg	9000
agccaggtag cttgagttcg aggcgctcgg attcctcaat gaagaccact ggttctcgcg	9060
tgaaaactct tacagtggag tagaaggaga aggactgcac aagctgggat acatcttgag	9120
agatatttcc aagatacccg gaggagccat gtatgctgat gacacagccg gttgggacac	9180
aagaataaca gaagatgacc tgcacaatga ggaaaaatc acacagcaga tggaccctga	9240
acacaggcag ctagcgaacg ctatattcaa gtcacatac caaaacaaag tggtaaagt	9300
ccaacgacca actccaaagg gcacggtaat ggacatcata tctaggaaaag accaaaggg	9360
cagtggacag gtgggaactt atggtctgaa cacattcacc aacatggaag cccagctaat	9420
cagacaaatg gaaggagaag gcgtgttgtc aaaggcagac ctcgagaacc cccatccgct	9480
agagaagaaa attacacaat ggttggaac taaaggagt gaaagggtta aaagaatggc	9540
catcagcggg gatgattgag ttgtgaaacc aatcgacgac agattcgcca atgccctgct	9600
tgcctgaac gatatgggaa aggttagaaa ggacatacct caatggcagc catcaaaggg	9660
atggcatgat tggcaacagg tccccctctg ctcccaccac tttcatgaat tgatcatgaa	9720
agatggaaga aagtggtag ttccctgcag accccaggac gaactaatag gaagagcgag	9780
aatctcccaa ggagcaggat ggagccttag agaaactgca tgtctaggga aagcctacgc	9840
tcaaagtgtg gctctcatgt attttcacag aagagatctt agactagcat ccaacgcat	9900
atgttcagca gtaccagtcc actgggtccc cacgagcaga acgacatggt ctattcatgc	9960
tcaccatcag tggatgacta cagaagacat gcttactgtc tggaacaggg tgtggataga	10020

```

ggacaatcca tggatggaag acaaaactcc agtcacaacg tgggaagatg ttccatatct 10080
aggggaagaga gaagaccaat ggtgcggatc actcataggt ctcaattcca gagcaacctg 10140
ggcccagaac atactcacag caatccaaca ggtgagaagc ctcataggca atgaagagtt 10200
tctggactac atgccttcga tgaagagatt caggaaggag gaggagtcag agggagccat 10260
ttggtaaaag caggaggtaa actgtcaggc cacattaagc cacagtacgg aagaagctgt 10320
gcagcctgtg agccccgtcc aaggacgtta aaagaagaag tcaggcccaa aagccacggt 10380
ttgagcaaac cgtgctgcct gtagctccgt cgtggggacg taaagcctgg gaggctgcaa 10440
accgtggaag ctgtacgcac ggtgtagcag actagtgggt agaggagacc cctcccatga 10500
cacaacgcag cagcggggcc cgagcactga gggaaagtgt acctccttgc aaaggactag 10560
aggttagagg agaccccccg caaacaacaaa cagcatattg acgctgggag agaccagaga 10620
tcctgctgtc tcctcagcat cattccaggc acagaacgcc agaaaatgga atggtgctgt 10680
tgaatcaaca ggttctagt 10699

```

```

<210> 42
<211> 10648
<212> DNA
<213> Vírus da Dengue

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10648)
<223> LAV4

```

```

<400> 42
agttgttagt ctgtgtggac cgacaaggac agttccaaat cggaagcttg cttaacacag 60
ttctaacagt ttgtttgaat agagagcaga tctctggaaa aatgaaccaa cgaaaaaagg 120
tggttagacc acctttcaat atgttgaaac gcgagagaaa ccgcttatca acccctcaag 180
ggttggtgaa gagatttctca accggacttt tttctgggaa aggaccctta cggatggtgc 240
tagcattcat cacgtttttg cgagtccttt ccatcccacc aacagcaggg attctgaaaa 300
gatggggaca gttgaagaaa aataaggcca tcaggatact gattggattc aggaaggaga 360
taggccgcat gctgaacatc ttgaacggga gaaaaagggtc aacgataaca ttgctgtgct 420
tgattccac cgtaatggcg tttcacttgt caacaagaga tggcgaaccc ctcatgatag 480
tggcaaaaaca tgaaaggggg agacctctct tgtttaagac aacagagggg atcaacaaat 540
gcactctcat tgccatggac ttgggtgaaa tgtgtgagga cactgtcacg tataaatgcc 600
ccttactggt caataccgaa cctgaagaca ttgattgctg gtgcaatctc acgtctacct 660
gggtcatgta tgggacatgc acccagagcg gagaacggag acgagagaag cgctcagtag 720
ctttaacacc acattcagga atgggatttg aaacaagagc tgagacatgg atgtcatcgg 780
aaggggcttg gaagcatgct cagagagtag agagctggat actcagaaac ccaggattcg 840
cgctcttggc aggatttatg gcttatatga ttgggcaaac aggaatccag cgaactgtct 900

```

tctttgtcct aatgatgctg gtcgccccat cctacggaat gcgatgcgta ggagtaggaa	960
acagagactt tgtggaagga gtctcaggtg gagcatgggt cgatctggtg ctagaacatg	1020
gaggatgcgt cacaaccatg gcccagggaa aaccaacctt ggattttgaa ctgactaaga	1080
caacagccaa ggaagtggct ctgttaagaa cctattgcat tgaagcctca atatcaaaca	1140
taaccacggc aacaagatgt ccaacgcaag gagagcctta tctaaaagag gaacaagacc	1200
aacagtacat ctgccggaga gatgtggttag acagaggggtg gggcaatggc tgtggcttgt	1260
ttggaaaagg aggagtgtgtg acatgtgca agttttcatg ttcggggaag ataacaggca	1320
atgttggtcca aattgagaac cttgaataca cagtggttgt aacagtccac aatggagaca	1380
cccatgcagt aggaaatgac acatccaatc atggagttac agccacgata actcccaggt	1440
caccatcggg ggaagtcaaa ttgccggact atggagaact aacactcgat tgtgaaccca	1500
ggctctggaat tgactttaat gagatgattc tgatgaaaat gaaaaagaaa acatggcttg	1560
tgcataagca atgggttttg gatctacctc taccatggac agcaggagca gacacatcag	1620
aggttcactg gaattacaaa gagagaatgg tgacatttaa ggttcctcat gccaaagagac	1680
aggatgtgac agtgctggga tctcaggaag gagccatgca ttctgccctc gctggagcca	1740
cagaagtgga ctccggtgat ggaaatcaca tgtttgagg acatctcaag tgcaaagtcc	1800
gtatggagaa attgagaatc aagggaatgt catacacgat gtgttcagga aagttctcaa	1860
ttgacaaaaga gatggcagaa acacagcatg ggacaacagt ggtgaaagtc aagtatgaag	1920
gtgctggagc tccgtgtaaa gtccccatag agataagaga tgtgaacaag aaaaaagtgg	1980
ttgggcgat catctcatcc accccttttg ctgagaatac caacagtgca accaacatag	2040
agttagaacc cccctttggg gacagctaca tagtgatagg tgttggaaac agtgcattaa	2100
cactccattg gttcaggaaa gggagttcca ttggcaagat gtttgagtcc acatacagag	2160
gtgcaaacg aatggccatt ctaggtgaaa cagcttggga ttttggttcc gttggtggac	2220
tgttcacatc attgggaaag gctgtgcacc aggttttttg aagtgtgtat acaaccatgt	2280
ttggaggagt ctcatggatg attagaatcc taattgggtt cctagtgttg tggattggca	2340
cgaactcaag gaacacttca atggctatga cgtgcatagc tgttggagga atcactctgt	2400
ttctgggctt cacagttcaa gcagacatgg gttgtgtggt gtcatggagt gggaaagaat	2460
tgaagtgtgg aagcggaaat tttgtggttg acaacgtgca cacttgga gaacagtaca	2520
aatttcaacc ggagtcccca gcgagactag cgtctgcaat attgaatgcc cacaagatg	2580
gggtctgtgg aattagatca accacgaggc tggaaaatgt catgtggaag caaataacca	2640
acgagctaaa ttatgttctc tgggaaggag gacatgacct cactgtagt gctggggatg	2700
tgaagggggt gttgacaaa ggcaagagag cactcacacc cccagtgaat gatctgaaat	2760
attcatggaa gacatgggga aaagcaaaaa tttcacccc agaagcaaga aatagcacat	2820
ttttaataga cggaccagac acctccgaat gcccgaatga acgaagagca tggaaactttc	2880
ttgaggtgga agactatgga tttggcatgt tcacgaccaa catatggatg aaattccgag	2940

aaggaagttc	agaagtgtgt	gaccacaggt	taatgtcagc	ggcaattaaa	gatcagaaaag	3000
ctgtgcatgc	tgacatgggt	tattggatag	agagctcaaa	aaaccagacc	tggcagatag	3060
agaaagcatc	tcttattgaa	gtgaaaacat	gtctgtggcc	caagaccac	acattgtgga	3120
gcaatggagt	gctggaaaagc	cagatgctca	ttccaaaatc	atatgcgggc	cctttttcac	3180
accacaatta	ccgccagggc	tatgccacgc	aaaccgtggg	cccatggcac	ttaggcaa	3240
tagagataga	ctttggagaa	tgccccggaa	caacagtcgc	aattcaggag	gattgtgacc	3300
atagaggccc	atctttgagg	accaccactg	catctggaaa	actagtcacg	caatggtgct	3360
gccgctcctg	cacgatgcct	cccttaaggt	tcttgggaga	agatgggtgc	tggtatggga	3420
tggagattag	gcccttgagt	gaaaaagaag	agaacatggt	caaatcacag	gtaacggccg	3480
gacagggcac	atcagaaact	ttttctatgg	gtctgtttgtg	cctgaccttg	tttgtggaag	3540
aatgcttgag	gagaagagtc	actaggaaac	acatgatatt	ggttgtggtg	atcactcttt	3600
gtgccatcat	cctaggaggc	ctcacatgga	tggacttact	acgagccctc	atcatgttgg	3660
gggacactat	gtctggtaga	ataggaggac	agatccacct	agccatcatg	gcagtgttca	3720
agatgtcacc	aggatacgtg	ctgggtgtgt	ttttaaggaa	actcacttca	agagagacag	3780
cactaatggt	aataggaatg	gccatgacaa	cggtgctttc	aattccacat	gaccttatgg	3840
aactcattga	tggaatatca	ctggggctaa	ttttgctaaa	aatagtgaca	cattttgaca	3900
acacccaagt	gggaacctta	gccctttcct	tgaccttcat	aagatcaaca	atgccattgg	3960
tcattggcttg	gaggaccatt	atggctgtgt	tgtttgtggt	cacactcatt	cctttgtgca	4020
ggacaagctg	tcttcaaaaa	cagtctcatt	gggtagaaat	aacagcactc	atcctaggag	4080
ccaagctct	gccagtgtac	ctaatgactc	ttatgaaagg	agcctcaaga	agatcttggc	4140
ctcttaacga	gggcataatg	gctgtgggtt	tggtagtct	cttaggaagc	gctcttttaa	4200
agaatgatgt	cccttttagct	ggcccaatgg	tggcaggagg	cttacttctg	gcggcttacg	4260
tgatgagtgg	tagctcagca	gatctgtcac	tagagaaggc	cgccaatgtg	cagtgggatg	4320
aaatggcaga	cataacaggc	tcaagcccaa	tcatagaagt	gaagcaggat	gaagatggct	4380
ctttctccat	acgggacgtc	gaggaaacca	atatgataac	ccttttggtg	aaactggcac	4440
tgataacagt	gtcaggcttc	tacccttgg	caattccagt	cacaatgacc	ttatggtaca	4500
tgtggcaagt	gaaaacacaa	agatcaggag	ccctgtggga	cgtcccctca	cccgtgccca	4560
ctcaaaaagc	cgactgtct	gaaggagtgt	acaggatcat	gcaaagaggg	ttatttggga	4620
aaactcaggt	tggagttagg	atacacatgg	aaggtgtatt	tcacacaatg	tggcatgtaa	4680
caagaggatc	agtgatctgc	catgagactg	ggagattgga	gccatcttgg	gctgacgtca	4740
ggaatgacat	gatatcatat	ggtgggggat	ggagacttgg	agacaaatgg	gacaaagaag	4800
aagatgttca	ggtcctcgcc	atagaaccag	gaaaaaatcc	taaacatgtc	caaacgaaac	4860
ccggcctttt	caagacccta	actggagaaa	ttggagcagt	aacattagat	ttcaaaccctg	4920
gaacgtctgg	ttctcccatc	atcaacagga	aaggaaaagt	catcggactc	tatggaaatg	4980

gagtagttac	caaatcaggt	gattacgtca	gtgccataac	gcaagccgaa	agaattggag	5040
agccagatta	tgaagtggat	gaggacattt	ttcgaaagaa	aagattaact	ataatggact	5100
tacaccccg	agctggaaag	acaaaaagaa	ttcttccatc	aatagtgaga	gaagccttaa	5160
aaaggaggct	gcgaaccttg	atcttggctc	ccacgagagt	ggtggcggcc	gagatggaag	5220
aggccctacg	tggactgcca	atccgttata	agaccccgag	tgtgaaatca	gaacacacag	5280
gaagagagat	tgtagacctc	atgtgtcatg	caaccttcac	aacaagactt	ttgtcatcaa	5340
ccagagttcc	aaattacaac	ctcatagtga	tggatgaagc	acatttcacc	gaccttctta	5400
gtgtcgcggc	tagaggatac	atctcgacca	gggtggaaat	gggagaggca	gcagccatct	5460
tcatgaccgc	aacccctccc	ggagcgacag	atccctttcc	ccagagcaac	agcccaatag	5520
aagacatcga	gagggaaatt	ccggaaaggt	catggaacac	agggttcgac	tggataacag	5580
actaccaagg	gaaaactgtg	tggtttgttc	ccagcataaa	agctggaaat	gacattgcaa	5640
attgtttgag	aaagtctggg	aagaaagtta	tccagttgag	taggaaaacc	tttgatacag	5700
agtatccaaa	aacgaaactc	acggactggg	atcttgtggt	cactacagac	atatctgaaa	5760
tgggggccaa	ttttagagct	gggagagtga	tagaccctag	gagatgcctc	aagccagtta	5820
tcctaacaga	tgggcccagag	agagtcattt	tagcaggtcc	tattccagtg	actccagcaa	5880
gcgctgtctca	gagaagaggg	cgaataggaa	ggaacccagc	acaagaagac	gaccaatacg	5940
ttttctccgg	agaccacta	aaaaatgatg	aagatcatgc	ccactggaca	gaagcaaaga	6000
tgctgcttga	caatatctac	accccagaag	ggatcattcc	aacattgttt	ggtccggaaa	6060
gggaaaaaac	ccaagccatt	gatggagagt	ttcgccctcag	aggggaacaa	aggaagactt	6120
ttgtggaatt	aatgaggaga	ggagaccttc	cggtgtggct	gagctataag	gtagcttctg	6180
ctggcatttc	ttacaaagat	cgggaatggt	gcttcacagg	ggaaaggaat	aaccaaattt	6240
tagaagaaaa	catggagggt	gaaatttggg	ctagagaggg	agaaaagaaa	aagctaaggc	6300
caagatgggt	agatgcacgt	gtatacgtg	accccatggc	tttgaaggat	tttaaggagt	6360
ttgctagtgg	aaggaagagc	ataactctcg	acatcctaac	agagattgcc	agtttgccaa	6420
cttacctttc	ctctagggcc	aagctcgccc	ttgataacat	agtcatgctc	cacacaacag	6480
aaagaggagg	gagggcctac	caacacgccc	tgaacgaact	cccggagtca	ctggaaacac	6540
ttatgcttgt	agctttacta	ggtgctatga	cagcaggtat	cttcctgttt	ttcatgcaag	6600
ggaaaggaat	agggaaattg	tcaatgggtt	tgataaccat	tgcggtggct	agtggcttgt	6660
tctgggtagc	agaaattcaa	ccccagtggg	tagcggcctc	aatcatacta	gagttttttc	6720
tcatgggtact	gttgataaccg	gaaccagaaa	aacaaaggac	cccacaagac	aatcaattga	6780
tctacgtcat	attgaccatt	ctcaccatta	ttggtctcat	agcagccaac	gagatggggc	6840
tgattgaaaa	aacaaaaacg	gattttgggt	tttaccaggt	aaaaacagaa	accaccatcc	6900
tcgatgtgga	cttgagacca	gcttcagcat	ggacgctcta	tgcagtagcc	accacawttc	6960
tgactcccat	gctgagacac	accatagaaa	acacgtcggc	caacctatct	ctagcagcca	7020

ttgccaacca	ggcggccgtc	ctaattggggc	ttggaaaagg	atggcccgtc	cacagaatgg	7080
acctcggtgt	gccgctgtta	gcaatgggat	gctattctca	agtgaacca	acaactttga	7140
cagcatcctt	agtcattgctt	tcagtccatt	atgcaataat	aggtccagga	ttgcaggcaa	7200
aagccacaag	agaggcccag	aaaaggacag	ctgctgggat	catgaaaaac	cccacggtgg	7260
acgggataac	agtaatagat	ctagaaccaa	tatcctatga	cccaaaattt	gaaaagcaat	7320
tagggcaggt	catgctactc	gtcttggtg	ctggacaact	actcttgatg	agaacaacat	7380
gggctttctg	tgaagtcttg	actttggcca	caggaccaat	cttgaccttg	tgggagggca	7440
acccgggaag	gttttggaac	acgaccatag	ccgtatccac	cgccaacatt	ttcaggggaa	7500
gttacctggc	gggagctgga	ctggcttttt	cactcataaa	gaatgyacaa	acccttagga	7560
ggggaactgg	gaccacagga	gagacactgg	gagagaagtg	gaagagacag	ctaaactcat	7620
takacagaaa	agagtttgaa	gagtataaaa	gaagtgggat	actagaagtg	gacaggactg	7680
aagccaagtc	tgccctgaaa	gatgggtcta	aatcaagca	tgcatgtatc	agaggggtcca	7740
gtaagattag	atggattggt	gagagagggg	tggtaaagcc	aaaagggaaa	gttgtagatc	7800
ttggctgtgg	gagaggagga	tggtcttatt	acatggcgac	gctcaagaac	gtgactgaag	7860
tgaaagggta	tacaaaagga	ggtccaggac	atgaagaacc	gattcccatg	gctacttatg	7920
gctggaattt	ggtcaaaactc	cattcagggg	ttgacgtggt	ctacaaaccc	acagagcaag	7980
tggacaccct	gctctgtgat	attggggagt	catcttctaa	tccaacaata	gaggaaggaa	8040
gaacattaag	agttttgaag	atggtggagc	catggctctc	ttcaaaacct	gaattctgca	8100
tcaaagtcct	taacccttac	atgccaacag	tcatagaaga	gctggagaaa	ctgcagagaa	8160
aacatggtgg	gaaccttgct	agatgcccgc	tgtccaggaa	ctccacccat	gagatgtatt	8220
gggtgtcagg	agcgtcggga	aacattgtga	gctctgtgaa	cacaacatca	aagatgttgt	8280
tgaacaggtt	cacaacaagg	cataggaaac	ccacttatga	gaaggacgta	gatcttgggg	8340
caggaacgag	aagtgtctcc	actgaaacag	aaaaaccaga	catgacaatt	attgggagaa	8400
ggcttcagcg	attgcaagag	gagcacaaag	aaacctggca	ttatgatcag	gaaaacccat	8460
acagaacctg	ggcgtatcat	ggaagctatg	aagctccttc	gacaggctct	gcacctcca	8520
tggtgaacgg	ggtagtataa	ctgctaacaa	aaccttgga	tgtggttcca	atggtgaccc	8580
agttagccat	gacagacaca	acctttttg	ggcaacaaag	agtgttcaaa	gagaagggtg	8640
ataccagaac	accacaacca	aaaccggga	cacgaatggt	tatgaccacg	acagccaatt	8700
ggctgtgggc	cctccttggg	aagaagaaaa	atcccagact	gtgcacaagg	gaagagttca	8760
tctcaaaagt	tagatcaaac	gcagccatag	gcgcagtctt	tcaggaagaa	cagggatgga	8820
catcagccag	tgaagctgtg	aatgacagcc	ggttttggga	actggttgac	aaagaaaggg	8880
ccctacacca	ggaagggaaa	tgtgaatcgt	gtgtctacaa	catgatggga	aaacgtgaga	8940
aaaagttagg	agagtttggt	agagccaagg	gaagccgagc	aatctggtac	atgtggctgg	9000
gagcgcggtt	tctggaattt	gaagccctgg	gttttttgaa	tgaagatcac	tggtttgga	9060

gagaaaattc atggagtgga gtggaagggg aaggtctgca cagattggga tatatcctgg	9120
aggagataga caagaaggat ggagacctaa tgtatgctga tgacacagca ggctgggaca	9180
caagaatcac tgaggatgac cttcaaatg aagaactgat cacggaacag atggccccc	9240
accacaagat cctagccaaa gccattttca aactaaccta tcaaaacaaa gtggtgaaag	9300
tcctcagacc cacaccgaga ggagcgggtga tggatatcat atccaggaaa gaccaaagag	9360
gtagtggaca agttggaaca tatggtttga acacattcac caacatggaa gttcaactca	9420
tccgccaaat ggaagctgaa ggagtcacata cacaagatga catgcagaac caaaagggt	9480
tgaagaaaag agttgagaaa tggctgaaag agtgtggtgt cgacaggta aagaggatgg	9540
caatcagtgg agacgattgc gtggtgaagc ccctggatga gaggtttggc acttccctcc	9600
tcttcttgaa cgacatggga aaggtgagga aagacattcc gcagtggga ccatctaagg	9660
gatggaaaaa ctggcaagag gttccttttt gctcccacca ctttcacaag atcttcatga	9720
aggatggccg ctactagtgt gttccatgta gaaaccagga tgaactgata gggagagcca	9780
gaatctcgca gggggctgga tggagcttaa gagaaacagc ctgcctgggc aaagcttacg	9840
cccagatgtg gtcgctcatg tacttccaca gaagggatct gcgttttagcc tccatggcca	9900
tatgctcagc agttccaacg gaatggtttc caacaagcag aacaacatgg tcaatccacg	9960
ctcatcatca gtggatgacc actgaagata tgctcaaagt gtggaacaga gtgtggatag	10020
aagacaaccc taatatgact gacaagactc cagtccattc gtgggaagat ataccttacc	10080
tagggaaaag agaggatttg tgggtgtggat ccctgattgg actttcttcc agagccacct	10140
gggcgaagaa cattcacacg gccataaccc aggtcagaaa cctgatcggg aaagaggaat	10200
acgtggatta catgccagta atgaaaagat acagcgtcc ttcagagagt gaaggagttc	10260
tgtaattacc aacaacaaac accaaaggct attgaagtca ggccattgt gccacggctt	10320
gagcaaaccg tgctgcctgt agctccgcca ataatgggag gcgtgaaatc ctagggagg	10380
ccatgcgcca cggaagctgt acgcgtggca tattggacta gcggttagag gagaccctc	10440
ccatcactga caaaacgcag caaaaggggg ccgaagcca ggaggaagct gtactcctgg	10500
tggaaggact agaggttaga ggagaccccc ccaacacaaa aacagcatat tgacgctggg	10560
aaagaccaga gatcctgctg tctctgcaac atcaatccag gcacagagcg aagcaagatg	10620
gattggtggt gttgatccaa caggttct	10648

REIVINDICAÇÕES

1. CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-2 VIVO ATENUADA, caracterizada pelo fato de que compreende a seqüência SEQ ID Nº. 38, em que pelo menos os nucleotídeos nas posições 736, 1619, 4723, 5062, 9191, 10063, e 10507 estão mutados, com a condição de que os seguintes nucleotídeos não estão mutados: 57, 524, 2055, 2579, 4018, 5547, 6599, e 8571.

2. CEPA, de acordo com reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos um nucleotídeo é adicionalmente mutado na posição selecionada do grupo que consiste das posições 1638, 2520, 9222, e 10361.

3. CEPA, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a SEQ ID Nº. 38 compreende as mutações 736 G>C, 1619 G>A, 1638 A>G, 2520 G>A, 4723 T>A, 5062 G>C, 9191 G>A, 9222 A>G, 10063 T>A, e 10507 A>G.

4. CEPA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma substituição de um ou mais nucleotídeos em determinada posição do códon que não resulta em alteração na codificação do aminoácido em tal posição.

5. CEPA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que compreende a SEQ ID Nº.1.

6. COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa do vírus dengue-2 vivo atenuada, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 5, em um veículo farmacêuticamente aceitável.

7. COMPOSIÇÃO DE VACINA, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa do vírus dengue-2 vivo atenuada, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 5, em um veículo farmacêuticamente aceitável.

8. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 7,

caracterizada pelo fato de que é uma composição de vacina monovalente.

9. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que é uma composição de vacina multivalente para dengue.

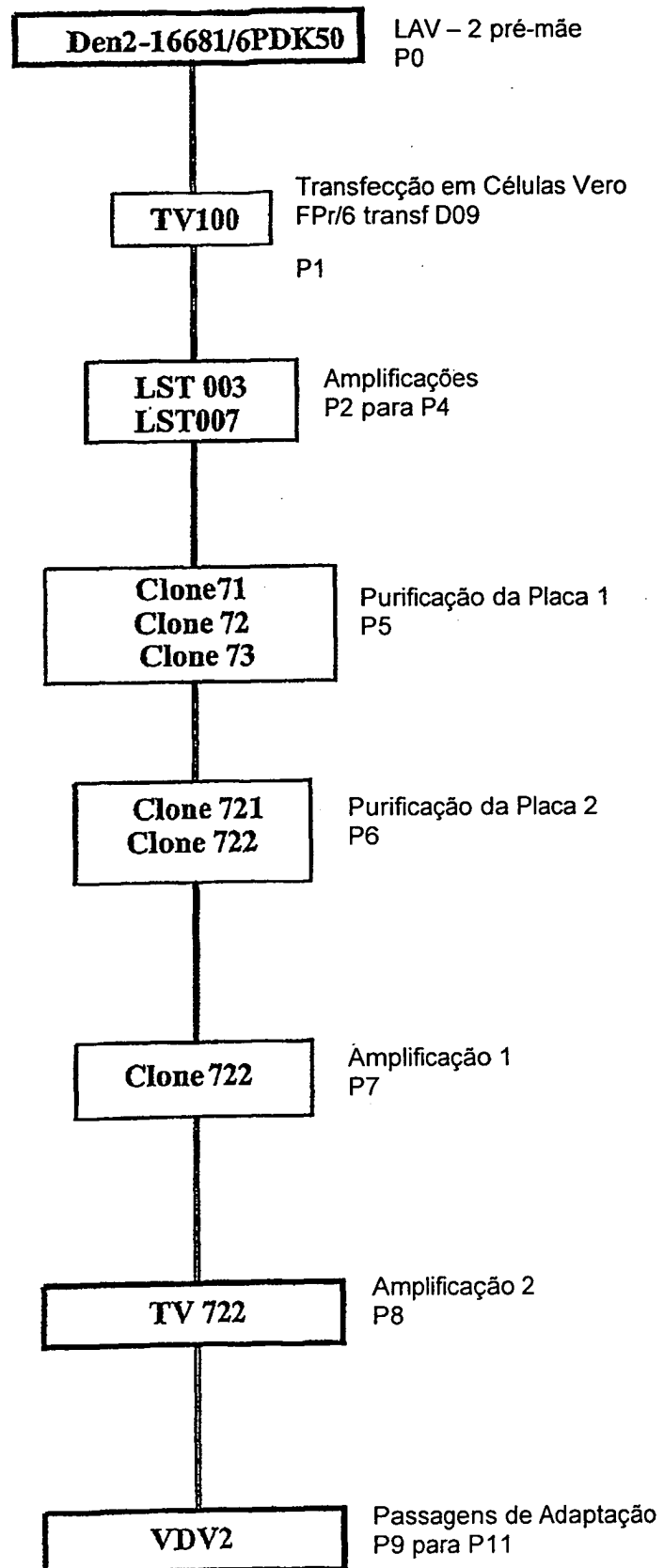
5 10. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa do vírus da dengue-2 vivo atenuada que compreende a sequência SEQ ID N°39.

10 11. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 7 a 10, caracterizada pelo fato de que contém de 10 a 10^5 CCID₅₀ da cepa do vírus da dengue-2 vivo atenuada, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 4.

12. ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de DNA SEQ ID N° 1 ou sua sequência de RNA equivalente.

15 13. POLIPROTEÍNA ISOLADA CODIFICADAS PELA SEQ ID N°1 OU FRAGMENTOS DESTA, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma arginina na posição 9 da proteína M, e/ou um ácido glutâmico na posição 228 da proteína E, e/ou uma treonina na posição 69 da proteína NS3, e/ou uma histidina na posição 181 da proteína NS3, e/ou uma lisina na
20 posição 541 da proteína NS5, e/ou uma treonina na posição 832 da proteína NS5.

14. FRAGMENTO DA POLIPROTEÍNA, conforme descrita na reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreendem a proteína M. e/ou proteína E, e/ou proteína NS3 e/ou proteína NS5.

**Fig. 1**

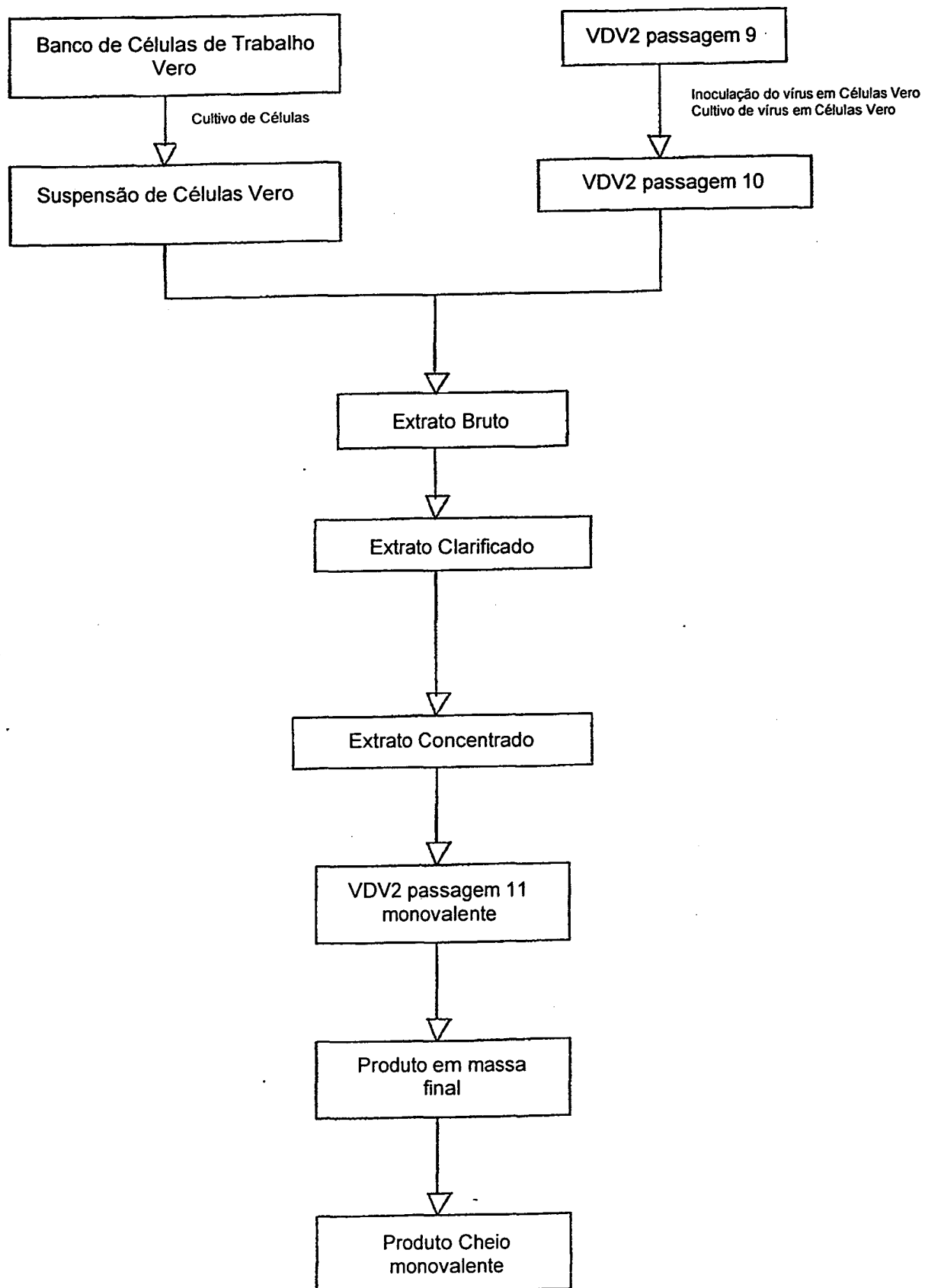
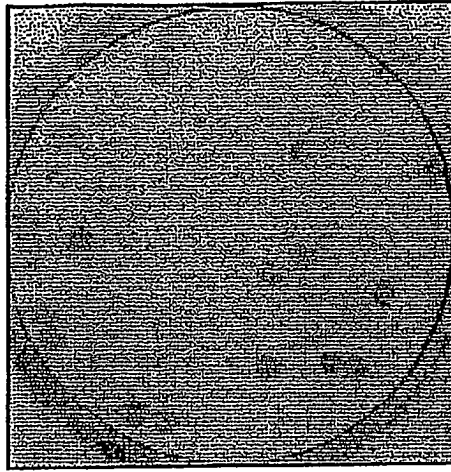
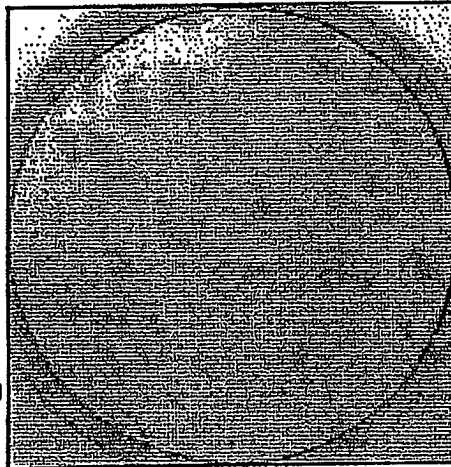
**Fig. 2**

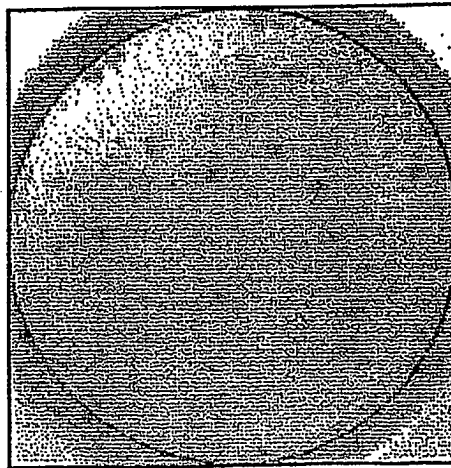
Fig. 3



Ceba 16681 (Dia 7)



VDV2 (Dia 7)



LAV2 (Dia 7)

Fig. 4

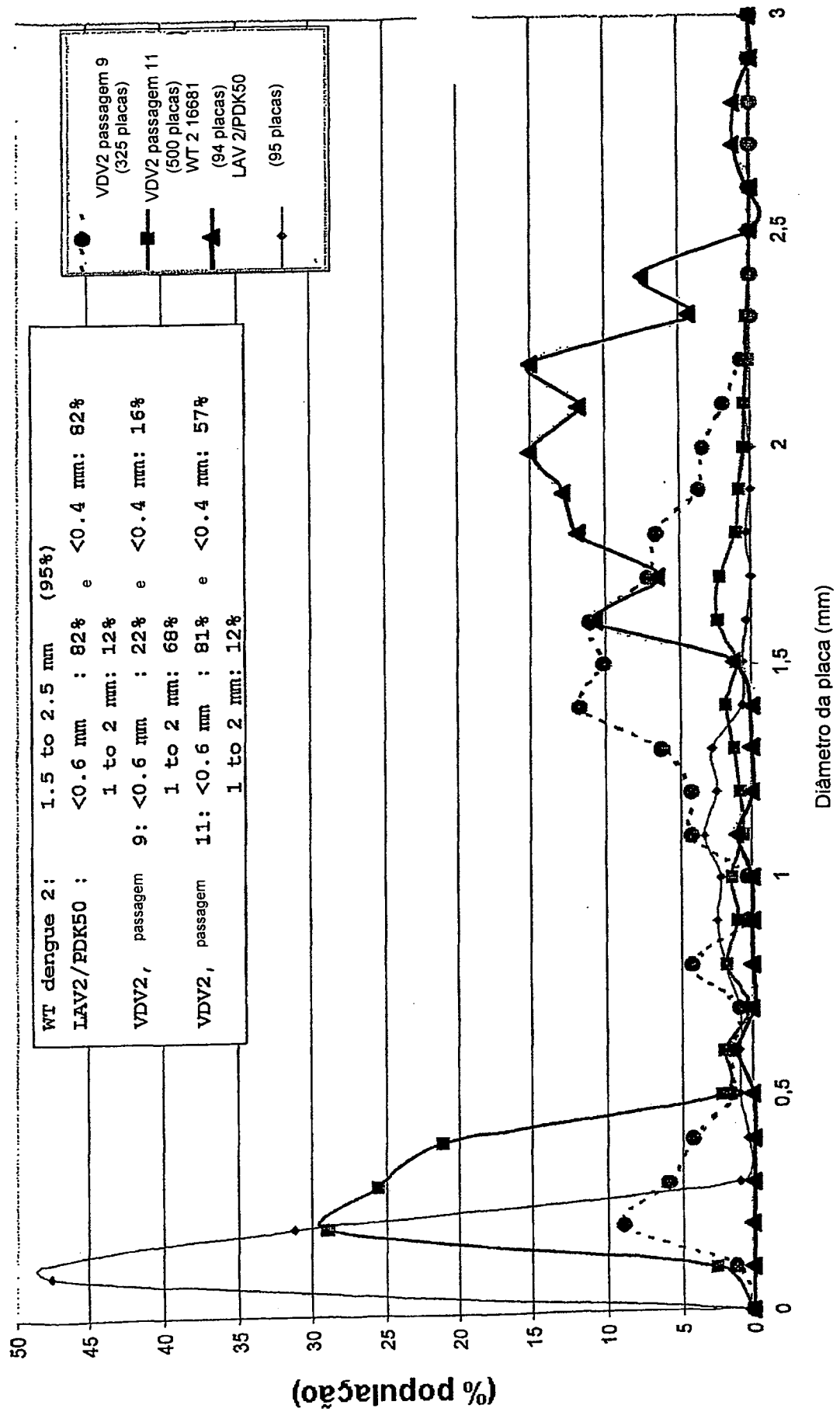


Fig. 5

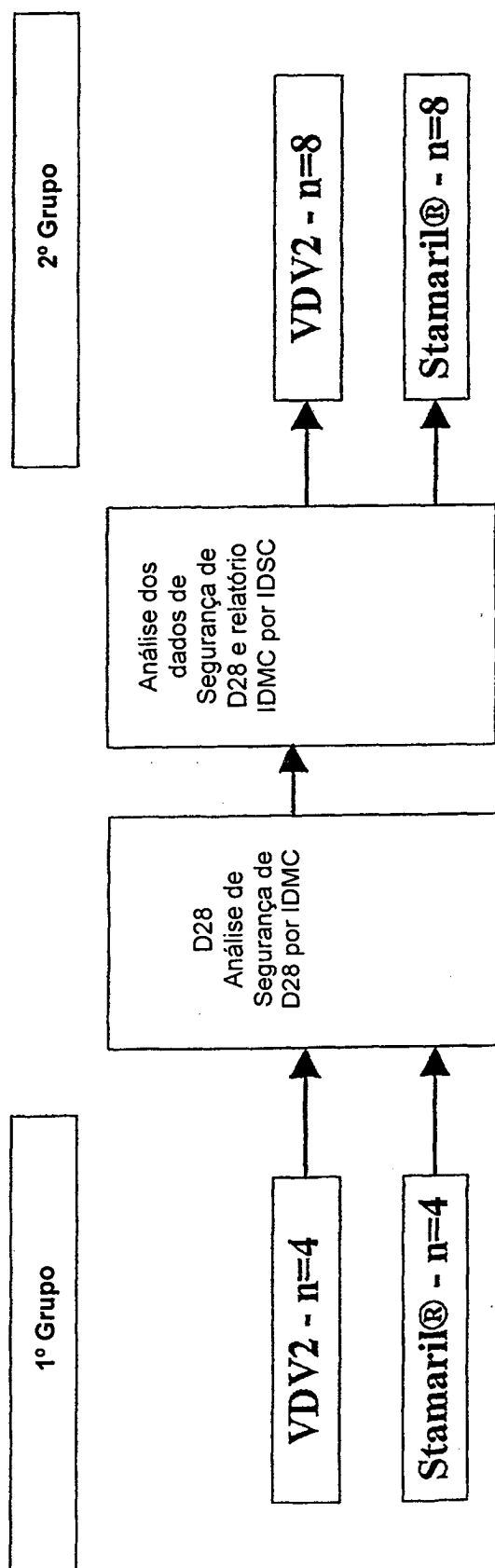


Fig. 6

RESUMO

**“CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-2 VIVO ATENUADA, COMPOSIÇÃO
IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO,
POLIPROTEÍNA ISOLADA CODIFICADAS PELA SEQ ID Nº.1 OU
5 FRAGMENTOS DESTA E FRAGMENTO DA POLIPROTEÍNA”**

A presente invenção se refere a cepas de VDV2 (vírus da dengue sorotipo-2 derivado de células VERO) vivo atenuada que foram obtidas a partir da cepa do vírus da dengue-2 tipo selvagem 16681 pela passagem em células PDK e células VERO. A presente invenção se refere também a uma
10 composição de uma vacina que inclui uma cepa VDV2.