

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

(21) **PI0613328-2 A2**

(22) Data de Depósito: 18/05/2006  
(43) Data da Publicação: 04/01/2011  
(RPI 2087)



(51) *Int.Cl.:*  
C07K 14/18

(54) Título: **CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-1 VIVO ATENUADO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO, POLIPROTEÍNA ISOLADA E FRAGMENTO DE POLIPROTEÍNA**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 US 60/691,243

(73) Titular(es): Centers For Disease Control And Prevention,  
Sanofi Pasteur

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

(74) Procurador(es): Priscila Penha de Barros Thereza

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006001313 de 18/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/134433 de 21/12/2006

(57) Resumo: CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-1 VIVO ATENUADO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO POLIPROTEÍNA ISOLADA E FRAGMENTO DE POLIPROTEÍNA. A presente invenção refere-se às cepas de vírus VDV1 vivos atenuados (vírus da dengue sorotipo-1 derivado de células VERO) que foram obtidas a partir de cepas 16007 do vírus da dengue-1 tipo selvagem pela passagem em células PDK e sanitização em células VERO. A presente invenção refere-se também a composição de uma vacina que inclui uma cepa do VDV1.



**“CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-1 VIVO ATENUADO, COMPOSIÇÃO  
IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO,  
POLIPROTEÍNA ISOLADA E FRAGMENTO DE POLIPROTEÍNA”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5           A presente invenção refere-se a novas cepas vivas de VDV1 atenuadas (vírus da dengue sorotipo-1 derivado de células VERO) que são obtidas a partir da dengue-1 tipo selvagem cepa 16007 pela passagem sobre células PDK e células Vero, e sanitização. A presente invenção refere-se também a uma composição de vacina que compreende tais cepas VDV1.

10                           **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

          A dengue é 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  
15   produzir um espectro de doenças clínicas que podem variar de uma síndrome viral não específica á 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, erupção cutânea,  
20   linfodenopatia 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 são freqüentes.

25           A dengue hemorrágica (FHD) 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 FHD 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 do vírus da dengue.

A doença da 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 FHD 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 FHD 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 do tráfego aéreo, a falta de controle efetivo 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 (DeFraithe *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 *et 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 reinfeção homotípica é completa e provavelmente para a vida toda, 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 FHD 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 FHD: uma rápida replicação viral com alta viremia (a gravidade da doença está relacionada com o nível de 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 FHD 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 se aplicar. Nenhuma vacina contra a dengue está atualmente registrada. Desde os 4 sorotipos de dengue que estão em circulação no mundo e uma vez que são relatados por estarem envolvidos nos casos de FHD, a vacinação deverá

idealmente conferir proteção contra todos os 4 sorotipos do vírus da dengue.

Vacinas vivas atenuadas (LAVs), que reproduzem a imunidade natural, foram utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra muitas doenças, incluindo alguns vírus pertencentes ao mesmo gênero da dengue (exemplos de vacinas de flavivírus vivos atenuados comercialmente disponíveis incluem vacinas da febre amarela e da encefalite japonesa). As vantagens de vacinas de vírus vivos atenuados 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 Vírião da vacina contra os diferentes componentes do vírus (proteínas estruturais e não estruturais) reproduz as respostas induzidas pelas infecções naturais.

O projeto 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 vivos atenuados foram desenvolvidos com êxito, a uma escala laboratorial, para o 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 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 1.159.968, 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 sequência completa da cepa do vírus da dengue-1 vivo

atenuado (LAV1), que foi criada por R. Kinney *et al.* (CDC, Fort Collins). Diferenças na sequência entre as cepas de origem DEN-1 cepa 16007 (SEQ ID N° 2) e cepa LAV1 (SEQ ID N° 3) estão descritas na Tabela 1. Assim, a comparação genética do vírus tipo selvagem cepa 16007 e da cepa LAV-1 demonstrou um conjunto de 14 mutações pontuais que podem estar ligados à atenuação da LAV1.

**TABELA 1: DIFERENÇAS NA SEQUÊNCIA DEN-1 16007 E DEN-1 16007/PDK13 (LAV1)**

| Coordenadas     |                | LAV1 (DEN-1 16007/PDK13) |            | 16007    |            |
|-----------------|----------------|--------------------------|------------|----------|------------|
| Gene-aa         | Posição        | Nt                       | aa         | nt       | aa         |
| <b>E-130</b>    | <b>Nt-1323</b> | <b>C</b>                 | <b>Ala</b> | <b>T</b> | <b>Val</b> |
| <b>E-203</b>    | <b>Nt-1541</b> | <b>A</b>                 | <b>Lys</b> | <b>G</b> | <b>Glu</b> |
|                 | <b>Nt-1543</b> | <b>G</b>                 |            | <b>A</b> |            |
| <b>E-204</b>    | <b>Nt-1545</b> | <b>A</b>                 | <b>Lys</b> | <b>G</b> | <b>Arg</b> |
| E-211           | Nt-1567        | G                        | Gln        | A        | Gln        |
| <b>E-225</b>    | <b>Nt-1608</b> | <b>T</b>                 | <b>Leu</b> | <b>C</b> | <b>Ser</b> |
| <b>E-477</b>    | <b>Nt-2363</b> | <b>G</b>                 | <b>Val</b> | <b>A</b> | <b>Met</b> |
| NS1-92          | Nt-2695        | C                        | Asp        | T        | Asp        |
| NS1-121         | Nt-2782        | T                        | Ala        | C        | Ala        |
| <b>NS3-182</b>  | <b>Nt-5063</b> | <b>A</b>                 | <b>Lys</b> | <b>G</b> | <b>Glu</b> |
| <b>NS3-510</b>  | <b>Nt-6048</b> | <b>T</b>                 | <b>Phe</b> | <b>A</b> | <b>Tyr</b> |
| <b>NS4A-144</b> | <b>Nt-6806</b> | <b>G</b>                 | <b>Val</b> | <b>A</b> | <b>Met</b> |
| NS4B-168        | Nt-7330        | G                        | Gln        | A        | Gln        |
| NS5-624         | Nt-9445        | T                        | Ser        | C        | Ser        |

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

A cepa LAV1, que foi inicialmente estabelecida em 1983 foi rapidamente identificada como candidata à vacina em potencial

(Bhamarapavati 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 LAV1 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 destas preocupações crescentes, o depositante decidiu criar um processo de sanitização, a fim de se livrar de tais riscos. Primeiro transferindo a vacina com LAV1 das células PDK para células VERO e, em seguida, transfectando células Vero com RNA genômico purificado de LAV1, seguida por duas etapas sucessivas de purificação da placa de vírus, o depositante elaborou um novo vírus sorotipo-1 derivado de Vero (VDV1).

Esta nova cepa VDV1, a qual tem sido, portanto, derivada pela transferência para células VERO e clonagem biológica, difere da cepa LAV1 pela sequência, homogeneidade de tamanho na placa e sensibilidade a temperatura, mas, sobretudo conserva algumas características fenotípicas e genotípicas do LAV1, como por exemplo, pontos de atenuação, fenótipo de pequenas placas, restrição de crescimento a alta temperatura, e foram conservadas as características imunogênicas das cepas LAV1. Estas características tornam esta nova cepa uma valiosa vacina candidata à vacinação profilática em seres humanos.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

##### **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-1 (DEN-1) cepa 16007, a sequência completa tem o comprimento de 10735 nucleotídeos (SEQ ID N° 2). O genoma RNA contém 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 (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 associada à proteína C para formar o núcleocápside (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) de dengue-1 resultam no isolamento do vírus modificado que são "vivos 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 baixo ou nenhum efeito secundário (ou seja, manifestações sistêmicas e/ou anormalidades biológicas e/ou reações locais) na maioria dos seres humanos testados, mas que continuam a infectar e 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 atenuados inicialmente derivados do vírus da dengue sorotipo-1 (DEN-1) cepa 16007 por passagens, por exemplo, 10, 11, 12 ou 13 passagens, em células primárias de rim de cachorro (PDK). Por exemplo, "LAV1/PDK13" é a cepa atenuada estabelecida após 13 passagens da cepa 16007 em células PDK (também chamado DEN-1 16007/PDK13). A sequência de nucleotídeos LAV1/PDK13 é

mostrada na SEQ ID N° 3.

"VDV1" quer dizer uma LAV obtida pelo processo de sanitização divulgado no presente pedido. Uma VDV1 é, assim, um clone biológico (homogêneo) do vírus da dengue sorotipo-1 adaptado em células VERO capaz de induzir uma resposta imune humoral incluindo neutralização de anticorpos em primatas especialmente no ser humano. As cepas de VDV1 da presente invenção podem ser facilmente reconstruídas iniciando diretamente a partir das seqüências de VDV1 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 4.1.2.2. Um 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.

O termo "mutação" significa 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 seqüência genômica ou poliprotéica do vírus da dengue-1 são designados ao abrigo da nomenclatura de Dunnen e Antonarakis (2000). Conforme definido por Dunnen e Antonarakis no nível de ácidos nucléicos, substituições são designadas por ">", por exemplo, "31 A>G" denota que uma A é alterada para uma G no nucleotídeo 31 da seqüência de referência.

As variações no nível da proteína descrevem a consequência da 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-1 DERIVADAS DE VERO (VDV1)**

A composição da vacina candidata LAV1 da dengue-1 anteriormente desenvolvida foi aperfeiçoada por um processo de sanitização.

O vírus da dengue sorotipo-1 derivadas de vero (VDV1) divulgada  
5 no presente pedido utiliza o vírus atenuado DEN-1 16007 por passagens em série por células PDK. O VDV1 contém toda a sequência genômica dos vírus vivos atenuados DEN-1, e produzem os mesmos sítios que foram ligados a atenuação como a cepa original LAV1, que foram testadas em seres humanos.

A sanitização da vacina candidata LAV1 foi feita através da  
10 remoção de proteínas e introduzindo apenas o material viral genômico purificado nas células Vero. Mais especificamente, a sanitização da cepa foi realizada em 2 etapas:

1) Amplificação do DEN16007/PDK11 (LAV1/PDK11) em células Vero, a 32 °C.

15 2) Purificação e transfecção de RNA viral nas células Vero.

A etapa 1, foi realizada por uma passagem de LAV1/PDK11 em células Vero. Para esse propósito, células Vero foram infectadas com LAV1/PDK11 a uma multiplicidade da infecção de 0,01 e incubadas a 32 °C durante 5 dias.

20 Para a etapa 2, vantagem foi levada em conta pelo fato de que o genoma viral é um RNA infeccioso, o que significa que ele é capaz, quando introduzida em uma célula, de reconstituir um vírus infeccioso completo. A segunda etapa de purificação e transfecção compreendiam assim as etapas que consistem em:

25 a) extração e purificação de RNA viral de vírus purificados da placa;

b) associação vantajosa do RNA purificado com lipídios catiônicos;

c) transfecção de célula Vero, em particular células Vero LS10;  
d) recuperação dos vírus neo-sintetizados; e  
e) purificação de uma cepa VDV por purificação de placas e, opcionalmente, amplificação em células hospedeiras, especialmente células Vero.

A tecnologia das células Vero é uma tecnologia bem conhecida, que tem sido utilizada para diferentes produtos comerciais (vacinas injetáveis e 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 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 clássico, uma solução aquosa tamponada composta que compreende 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 solvente farmacêutico ou excipiente como um NaCl a 4% estéril para reconstituir um composto líquido imunogênico ou vacina.

No seqüenciamento, a atenuação Loci específicas, dos vírus recuperados após a transfecção, não revelou qualquer mutação, em comparação com a cepa LAV1/PDK13. Os vírus VDV1 biologicamente clonados exibem um fenótipo de placa homogênea e uma notável estabilidade

genética no que diz respeito à sua cepa de origem LAV1 como esta pode ser deduzida principalmente a partir da conservação da atenuação genotípica.

A cepa VDV1 foi seqüenciada e, em comparação com a cepa do vírus da dengue sorotipo-1 vivo atenuado (LAV1/PDK13) seqüência (SEQ ID N° 3). Uma diferença no conjunto de 3 nucleotídeos foi encontrada no que diz respeito à referência da seqüência LAV1. Um deles é um aminoácido silenciado (posição 2719). Os outros dois (posições 5962 e 7947) situam-se em peptídeos não-estruturais codificando as seqüências (NS3-481 e NS5-125, respectivamente). Nenhuma destas diferenças corresponde a qualquer uma das posições de atenuação da LAV1.

A presente invenção fornece assim cepas do vírus da dengue-1 vivos atenuados que foram obtidos a partir de vírus DEN-1 16007 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 compreendem, pelo menos, as mutações identificadas de seqüência (não-silenciosa e opcionalmente silenciosa) em relação à seqüência nucleotídica ou seqüência poliprotéica das cepas DEN-1 16007 tipo selvagem e LAV1/PDK13.

Conseqüentemente, a presente invenção está relacionada a uma cepa isolada de vírus da dengue-1 vivo atenuado, que compreende, ou é constituído por uma seqüência da cepa LAV1/PDK13 (SEQ ID N° 3) onde pelo menos nucleotídeos nas posições 5962 e 7947, e, opcionalmente, 2719, estão mutados, com a condição de que os seguintes nucleotídeos não estão mutados: 1323, 1541, 1543, 1545, 1567, 1608, 2363, 2695, 2782, 5063, 6048, 6806, 7330, e 9445. De preferência, as mutações são substituições. De preferência, o nucleotídeo na posição 5962 é A, o nucleotídeo na posição 7947 é G. Ainda preferencialmente, a cepa isolada, de acordo com a presente invenção contém seqüência SEQ ID N° 3 que compreende as mutações 2719

G>A, 5962 C>A, e 7947 A>G.

Portanto, um vírus da dengue-1 vivo atenuado, de acordo com a presente invenção compreende a seqüência da cepa da dengue-1 16007 tipo selvagem (SEQ ID N° 2) onde a dita seqüência contém, pelo menos, as

5 mutações 1323 T>C, 1541 G> A , 1543 A> G, 1545 G> A, 1567 A> G, 1608 C> T, 2363 A> G, 2695 T> C, 2782 C> T, 5063 G> A, 5962 C> A, 6048 A> T , 6806 A> G, 7330 A> G, 7947 A> G, e 9445 C> T. De preferência, uma cepa viva atenuada, de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente a mutação 2719 G> A por referência à seqüência de nucleotídeos da cepa 16007

10 tipo selvagem (SEQ ID N° 2).

As cepas do vírus da dengue-1 vivos atenuados, de acordo com a presente invenção abrange cepas variantes que compreende uma seqüência SEQ ID N° 3 mutada nas posições 5962 e 7947, conforme acima definido, e que ainda incluem a substituição de um ou mais nucleotídeos em determinada

15 posição dos códons que resulta em qualquer alteração no aminoácido codificado nesta posição.

Vantajosamente, as cepas do vírus da dengue-1 vivos atenuados, de acordo com a presente invenção compreendem uma seqüência que se diferencia por um número limitado de mutações, por exemplo: Não mais que 5,

20 ainda preferencialmente não superior a 2, a partir SEQ ID N° 1.

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

A presente invenção refere-se também as cepas de vírus da dengue-1 vivo atenuado que podem ser obtidas a partir da cepa VDV1 da seqüência SEQ ID N° 1 por outras passagens em células, em particular em células Vero.

25

A presente invenção também diz respeito a um ácido nucléico

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.

Como utilizado na presente invenção, por seqüência RNA "equivalente" a SEQ ID N° 1 se entende uma seqüência SEQ ID N° 1 onde as deoxitimidinas foram substituídas por uridinas. Como a SEQ ID N° 1 constitui a seqüência cDNA VDV1, a seqüência RNA equivalente corresponde assim à fita RNA positiva do VDV1.

A presente invenção refere-se adicionalmente a poliproteínas da seqüência SEQ ID N° 41 e aos fragmentos desta. A SEQ ID N° 41 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 de, pelo menos, 8, pelo menos 12, pelo menos 20, aminoácidos.

Os ditos fragmentos de poliproteínas da seqüência SEQ ID N° 41 compreendem, pelo menos, uma lisina na posição 481 da proteína NS3 (posição 1956 da SEQ ID N° 41), e/ou de uma arginina na posição 125 da proteína NS5 (posição 2618 da SEQ ID N° 41).

Segundo um exemplo de realização o fragmento da poliproteína codificada pela SEQ ID N° 1 é ou compreende a 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 VDV1, de acordo com a presente invenção.

5 As composições imunogênicas, de acordo com a presente invenção produzem uma resposta imune humoral em direção ao vírus da dengue compreendendo a 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-1.

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 VDV1 de acordo com a presente invenção em combinação com, pelo menos, um vírus da dengue vivo atenuado selecionado do grupo constituído pelo sorotipo-2, 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 VDV1 de acordo com a presente invenção em combinação com uma cepa de vírus da dengue-2 vivo atenuado, uma cepa de vírus da dengue-3 vivo atenuado e uma cepa de vírus da dengue-4 vivo  
25 atenuado.

Cepas de vírus vivos atenuados da dengue-2, 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-2 (cepa 16681, passagem 53; LAV2), 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 nucleotídicas da LAV2 (SEQ ID N° 42), LAV3 (SEQ ID N° 43), e LAV4 (SEQ ID N° 44) estão demonstradas na lista de seqüência anexa.

Vantajosamente, uma cepa de vírus da dengue-2 vivo atenuado pode corresponder a uma cepa VDV2, que foi obtida a partir da cepa LAV2 desenvolvida pela Mahidol por um processo de sanitização em células Vero. Em especial, uma cepa de vírus da dengue-2 viva atenuada (VDV2) pode compreender, e vantajosamente consistir da seqüência SEQ ID N° 40.

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.

As composições imunogênicas ou vacinas, de acordo com a presente invenção podem ser preparadas utilizando qualquer método convencional conhecido pelo técnico 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 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 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  
5 com um pHmetro) entre 6 a 9.

A composição, de acordo com a presente invenção pode adicionalmente conter um adjuvante, ou seja, uma substância que melhora, ou aumenta, a resposta imune produzida pela cepa VDV1. Qualquer adjuvante ou mistura de adjuvantes farmacêuticamente aceitável convencionalmente  
10 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  
15 parenteral (por exemplo, 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**

20 A presente invenção fornece ainda um método de imunizar um 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.

25 Um "hospedeiro com tal necessidade" denota uma pessoa em situação de risco de infecção por dengue, ou seja, pessoas que viajam para regiões onde 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 corresponde a uma composição injetável administrada por via subcutânea, 5 vantajosamente na região deltóide.

A quantidade de LAV ou VDV em particular VDV1 nas composições imunogênicas ou vacinas podem ser convenientemente expressas em unidade virais formadoras de placas (PFU) ou unidade de doses infectantes de cultura celular 50% (CCID<sub>50</sub>) e preparadas utilizando técnicas 10 farmacêuticas convencionais. Por exemplo, a composição, de acordo com a presente invenção pode ser preparada na forma de dosagem contendo 10 a 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>, ou de 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub> de LAV ou VDV, por exemplo  $4 \pm 0,5 \log_{10}$  CCID<sub>50</sub> de cepa VDV1 de uma composição monovalente. Quando a composição é multivalente, para reduzir a possibilidade de interferência viral e, 15 assim, de conseguir um equilíbrio na resposta imune (ou seja, uma resposta imunológica contra todos os sorotipos contidos na composição), as 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 20 induzir uma resposta imune humoral compreendendo anticorpos neutralizantes no soro de uma vacina, como avaliado pelo teste de neutralização com redução em placa, conforme descrito na seção 4.1.2.2; 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 25 1:10.

O volume de administração pode variar, dependendo da via de administração. Injeções subcutâneas podem variar em termos de volume de 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  
5 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  
10 como apropriado pelo técnico no assunto.

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

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 é um resumo da história da semente pré-mãe ("*pre-master seed*") do VDV1.  
15

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  
20 do VDV1. 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 dengue-1 tipo selvagem 16007 e a cepa LAV1. Os asteriscos designam as variações nucleotídicas entre LAV1 e VDV1.

25 A Figura 4 mostra a análise do tamanho da placa após 7 dias de incubação a 37 °C para o vírus da dengue-1 LAV1, VDV1, e cepa 16007.

A Figura 5 é uma análise gráfica que mostra o tamanho da distribuição na placa para o vírus da dengue-1 LAV1, VDV1, e cepa 16007.

A Figura 6 é um resumo do desenho experimental para a avaliação da segurança do VDV1 monovalente, em adultos saudáveis sem precedentes de tratamento para flavivirus (flavivirus-naive).

### EXEMPLOS

5

#### EXEMPLO 1: SANITIZAÇÃO

##### 1.1 PURIFICAÇÃO DE RNA VIRAL

Foi inicialmente planejado realizar a sanitização da LAV1 pela purificação e transfecção do RNA viral diretamente extraída de uma das sementes das cepas da vacina, DEN-16007/PDK10 ou DEN-16007/PDK11 (produzidos pela Sanofi Pasteur. Título: 4,60 logTCID<sub>50</sub>/ml) . Foram realizados dessa maneira oito ensaios sem sucesso, com quantidades de RNA variando de 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> cópias. Em seguida, decidiu-se realizar uma passagem de adaptação em células Vero, antes da extração e transfecção do RNA.

Células Vero (VERO LS10 p142 to145) foram infectadas com uma amostra da semente mãe ("*master seed*") DEN-1/PDK11, em uma multiplicidade da infecção de 0,01, e incubada a 32 °C durante 5 dias. O meio de cultura foi então substituído por meio de infecção (contendo 10mM MgSO<sub>4</sub>). Efeitos citopáticos claros foram visíveis no dia seguinte, e a presença de RNA viral no sobrenadante da cultura foi confirmada por RT-PCR. O meio de cultura foi recolhido ao dia 8 pós-infecção, diluído em um volume equivalente de uma solução aquosa tamponada contendo agentes crioprotetores (pH= 7,5) e mantidos congelados a -70 °C até serem utilizados. Este vírus amplificado em Vero foi denominado DEN-1/V100. Seu título infeccioso foi determinado em células Vero e foi de 6,9 logTCID<sub>50</sub>/ml.

25

O processo de purificação e transfecção de RNA foi realizado da seguinte forma. Uma suspensão de DEN-1 V100 foi diluída, a fim de conter, pelo menos, 3 × 10<sup>4</sup> e até 3 × 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> 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  $\beta$  mercaptoetanol (tampão RTL-  $\beta$  mercaptoetanol, fornecidos no kit RNeasy Mini Kit, Qiagen Ref. 74104), foram  
5 adicionados e proteínas foram extraída 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  
10 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  
15 curva padrão estabelecido com quantidades conhecidas do vírus em TCID<sub>50</sub>/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  
20 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 x 10<sup>6</sup> células por poço em um placa de 6 poços), com doses crescentes (5 a 20  $\mu$ L) de lipofectamina. As células foram então incubadas por 4 a 5 horas a  
25 32 °C, 5% CO<sub>2</sub>, antes de substituir o meio por meio de cultura fresco, sem FCS, e a incubação continuou overnight a 32 °C. A toxicidade (células redondas, refringência 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.

Quatro transfecções foram realizadas em paralelo, utilizando 1/10 da preparação do RNA purificado (o que corresponde à cerca de  $4 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>). Foram diluídos doze microlitros da solução de RNA em 500 µL de meio OptiMEM (GIBCO) contendo 10 µL de reagente LF2000 (uma mistura de lipídios catiónicos que associado ao RNA através interações de 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 placas confluentes de células Vero. Após 4 horas de incubação a 32 °C, 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 da dengue (Williams complementada com 10 mM MgSO<sub>4</sub>).

Os efeitos citotóxicos moderados foram observados 24 horas após a transfecção e desapareceram no dia 3. Efeitos citopáticos típicos (células redondas, células refringentes) foram detectados cerca de 6 a 8 dias após a transfecção em todos os ensaios de transfecção. A liberação do vírus no sobrenadante dessas células foi confirmada por qRT - PCR. Os fluídos das culturas (3 ml) foram coletadas no dia 6 e no dia 8 após a transfecção, e agregadas. Os vírus foram diluídos em 6 ml de uma solução aquosa tamponada contendo agentes crioprotetores (pH = 7,5) e congelada até nova amplificação.

As quatro soluções virais obtidas após a transfecção foram

nomeadas de TV (para transfecções em células Vero) 100, TV200, TV300, TV400, e exibiram títulos de infecção semelhantes (vide abaixo):

TV100: 6.95 log TCID<sub>50</sub>

TV200: 6.80 log TCID<sub>50</sub>

5 TV300: 6.80 log TCID<sub>50</sub>

TV400: 6.85 log TCID<sub>50</sub>

De nota, a eficiência da transfecção não estava aumentada significativamente nas amostras transfectadas na presença do tRNA (TV300 e TV400).

### 10 **1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS RECUPERADOS APÓS A TRANSFECCÃO**

O tamanho das placas de DEN1-V100 e TV100 a 400 foram determinados. Resumidamente, células Vero foram plaqueadas na cultura a uma densidade de 1.000.000 células/cm<sup>2</sup>, 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, 15 5% CO<sub>2</sub>, o inóculo foi removido e as células foram incubadas a 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 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 20 flavivirus, diluído em 2,5 µg/ml. Placas virais foram mensuradas utilizando um software de análise de imagem (Saisam / Microvision).

Como controle, vírus DEN-1 16007 e LAV1 foram plaqueados em paralelo. Os dados são demonstrados na Tabela 1.

**TABELA 1: TAMANHO DAS PLACAS DO DEN-1 16007, LAV1, V100 (ANTES DA TRANSFECCÃO) E TVX00 (APÓS A TRANSFECCÃO).**

| Etapa                                         | Vírus           | Fenótipo     |               |
|-----------------------------------------------|-----------------|--------------|---------------|
|                                               |                 | Placa Grande | Placa Pequena |
|                                               | DEN1 16007 (wt) | 42           | 0             |
| Semente mãe/PDK11                             | MS-16007/PDK11  | 0            | 91            |
| Semente de trabalho<br>("working seed")/PDK12 | WS LST-22       | 0            | 84            |
| Semente em massa<br>("bulk seed")/PDK13       | D1-0010R1       | 0            | 188           |
| Amplificação de VERO                          | V100            | 0            | 90            |
| Vírus Transfectados                           | TV100           | 0            | 115           |
|                                               | TV200           | 1            | 90            |
|                                               | TV300           | 0            | 92            |
|                                               | TV400           | 0            | 107           |

O vírus V100, amplificado em células Vero, exibe um fenótipo em placa pequena homogênea (SP). Placas são um pouco maiores do que observado nas diferentes amostras de LAV1 (2-3 mm de diâmetro, em vez de <2 milímetros). Este fenótipo SP é mantido nos vírus recuperados após a transfecções. Uma placa grande (LP), entre 90 vírus plaqueados, foi detectada na amostra TV200. No entanto, esta proporção deslocou de 10 LP para 82 SP plaqueadas após apenas uma passagem de amplificação em células VERO sugerindo que a população LP era dominante.

De nota, o seqüenciamento de posições de atenuação importantes realizado em paralelo não revelou qualquer mutação no vírus transfectado, em comparação com o LAV1.

#### 1.4 PURIFICAÇÕES DE PLACAS

A amostra do vírus DEN-1/TV100, apresentando um fenótipo SP

homogêneo foi escolhido para a purificação da placa. 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% CO<sub>2</sub>, o inóculo foi removido e as células foram

5 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 solidifica-se 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% CO<sub>2</sub>. A segunda

10 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. Quatro poços isolado de placas pequenas foram colhidos sob condições estéreis usando uma micropipeta equipada com uma ponteira de 0,1 ml, e transferidas para tubos estéreis contendo 0,2 ml de MEM - 4% FCS. A

15 suspensão foi homogeneizada em um 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 seis SP foi realizada. Cada placa foi coletada e diluída em 1 ml de meio, antes da amplificação em células Vero, em frascos T25 cm<sup>2</sup>. O meio de cultura foi colhido no dia 6 após a

20 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 de DEN-1/TV111, DEN-1/TV112, DEN-1/TV121, DEN-1/TV131, DNE-1/TV132 e DEN-1/TV141,

25 respectivamente. O títulos de infecção foram determinados em células Vero (vide abaixo):

|                                        |                                        |
|----------------------------------------|----------------------------------------|
| TV111 = 6,85 LogCCID <sub>50</sub> /ml | TV112 = 6,80 LogCCID <sub>50</sub> /ml |
| TV121 = 6,80 LogCCID <sub>50</sub> /ml | TV131 = 6,70 LogCCID <sub>50</sub> /ml |

TV132 = 6,45 LogCCID<sub>50</sub>/ml      TV141 = 5,70 LogCCID<sub>50</sub>/ml

Uma segunda amplificação em células Vero foi realizada por três clonagens: TV111, TV112, TV121.

### 1.5 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS CLONADO

5                      Placas de tamanho DEN-1/TV111, DEN-1/TV112, DEN-1/TV121, DEN-1/TV131, DEN-1 TV132 e DEN-1/TV141 candidatas foram determinados. Os seqüenciamentos do loci específico da atenuação também foram realizados e não revelaram qualquer mutação (Tabela 2).

**TABELA 2: SEQÜENCIAMENTO DE LOCAIS ESPECÍFICOS DE ATENUAÇÃO DOS VÍRUS**

10

| <u>DEN-1</u>   |          |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
|----------------|----------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
|                |          | E     |      |      |      |      |      | NS1  |      |      | NS3  |      | NS4A | NS4B | NS5  |  |
| Etapa/Célula   | Vírus    | 1323  | 1541 | 1543 | 1545 | 1567 | 1608 | 2363 | 2695 | 2782 | 5063 | 6048 | 6806 | 7330 | 9445 |  |
| Não atenuado   | DEN-1    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
|                |          | T     | G    | A    | G    | A    | C    | A    | T    | C    | G    | A    | A    | A    | C    |  |
|                | /PGMK    | 16007 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
|                | DEN-1    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Vacina/PDK     | 16007/PD | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |
|                | K-13     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
|                | TV111    | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |
|                | TV112    | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |
| 2ª purificação | TV121    | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |
| da placa       | TV131    | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |
|                | VERO     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
|                | TV132    | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |
|                | TV141    | C     | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |  |

|              |          | E    |      |      |      |      |      | NS1  |      | NS3  |      | NS4A |      | NS4B |      | NS5 |  |
|--------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|--|
| Etapa/Célula | Vírus    | 1323 | 1541 | 1543 | 1545 | 1567 | 1608 | 2363 | 2695 | 2782 | 5063 | 6048 | 6806 | 7330 | 9445 |     |  |
| Semente pré- | VDV1     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |
| mãe/VERO     | (VERO-6) | C    | A    | G    | A    | G    | T    | G    | C    | T    | A    | T    | G    | G    | T    |     |  |

A posição dos nucleotídeos está indicada abaixo de cada gene e referida da cepa DEN-1 16007 SEQ ID Nº 2.

Na ausência de qualquer outro critério capaz de diferenciar entre estes clones, o TV121 foi arbitrariamente escolhido como “pré-mãe” para VDV1.

Em conclusão, um número total de 6 passagens em células VERO foram realizadas para adaptar e clonar as primeiras cepas DEN-1 16007/PDK11 atenuadas. O RNA viral foi purificado e transfectado em células VERO qualificadas, em condições montagem, com uma aplicação industrial (controle ambiental, rastreabilidade das matérias primas e experimentos, certificado de análise para produtos derivados de animais). A cepa VERO adaptada foi clonada por purificação em placa para gerar semente pré-mãe da vacina VDV1 candidata, na passagem número 6 em células VERO.

Contrariamente ao LAV1, o VDV1 apresenta um fenótipo do tamanho de placa pequena homogênea. Além disso, não foi identificada nenhuma mutação nas posições específicas de atenuação. Outras caracterizações foram realizadas, em seguida, pela determinação em larga escala da sequência completa e de testes fenotípicos de VDV1.

## EXEMPLO 2

### SEQÜENCIAMENTO

A sequência completa do vírus foi gerada, de acordo com a seguinte estratégia. Partindo de uma amostra contendo VDV1, o RNA

genômico foi extraído e purificado, e foi realizada transcrição reversa em cDNA. Então todas as amplificações de PCR sobrepostas foram realizadas a partir do cDNA, com a adição de marcadores de seqüenciamento em ambas as extremidades de cada produto de PCR. Todas as seqüências individuais foram geradas e analisadas em aparelhos automatizados. A etapa seguinte consistiu da reconstrução do genoma por vários alinhamentos de todas as seqüências individuais. Neste ponto, cada modificação inesperada no nucleotídeo, em relação à seqüência de referência, foi cuidadosamente re-analisada voltando aos dados brutos. Tal modificação foi sistematicamente confirmada por outro seqüenciamento realizado a partir de um novo produto de PCR. Depois que todas as ambigüidades foram resolvidos, o seqüenciamento do genoma viral foi concluído, assim como a nova molécula foi criada em um vetor de banco de dados NTi. Este pode ser utilizado para uma análise entre genomas, por múltiplos alinhamento de seqüências.

## **2.1 MATERIAIS**

### **2.1.1 VÍRUS**

Os vírus aos quais estão aqui mencionados são DEN-1 16007; LAV-1/PDK13; VDV1, as seqüências das quais são dadas na lista de seqüência anexa. O texto completo da seqüência genômica destes vírus é de 10735 nucleotídeos de comprimento.

### **2.1.2 PRIMERS**

Todos os primers foram projetados no “*Seqweb bioinformatics package*” (Accelrys), módulo de desenho de primers (Tabela 3).

**TABELA 3: LISTA DO RT-PCT E PRIMERS DE SEQÜENCIAMENTO**

| Nome | Seqüência de Primers | Nt<br>Inicial | Nt<br>Final | Comprimento<br>do Primer | Comprimento<br>do RT-PCR | Superposição |
|------|----------------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
|------|----------------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------|

| Nome       | Sequência de Primers                                    | Nt<br>Inicial | Nt<br>Final | Comprimento<br>do Primer | Comprimento<br>do RT-PCR | Superposição |
|------------|---------------------------------------------------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| D1 01<br>+ | GTTTCCAGTCACGACtactggaccgacaagaacag<br>(SEQ ID N° 4)    | 12            | 32          | 38                       | 897                      | -32          |
| D1 01<br>- | AACAGCTATGACCATGggaaggagttaccagcatcag<br>(SEQ ID N° 5)  | 928           | 908         | 37                       | 892                      | 201          |
| D1 02<br>+ | GTTTCCAGTCACGACtgaaacccgacgagacaaac<br>(SEQ ID N° 6)    | 688           | 707         | 37                       |                          | 173          |
| D1 02<br>- | AACAGCTATGACCATGaggtccaaggcagtggaag<br>(SEQ ID N° 7)    | 1598          | 1579        | 36                       |                          |              |
| D1 03<br>+ | GTTTCCAGTCACGACtggaaatgagaccacagaac<br>(SEQ ID N° 8)    | 1386          | 1406        | 38                       | 885                      | 146          |
| D1 03<br>- | AACAGCTATGACCATGgaaacaccgctgaacaaaac<br>(SEQ ID N° 9)   | 2289          | 2270        | 36                       |                          |              |
| D1 04<br>+ | GTTTCCAGTCACGACggttcaagaagggaagcag<br>(SEQ ID N° 10)    | 2106          | 2124        | 36                       | 903                      | 183          |
| D1 04<br>- | AACAGCTATGACCATGttctatccagtacccatgtc (SEQ<br>ID N° 11)  | 3028          | 3008        | 37                       |                          |              |
| D1 05<br>+ | GTTTCCAGTCACGACcagaataccaccttcatcatcg<br>(SEQ ID N° 12) | 2804          | 2825        | 39                       | 868                      | 232          |
| D1 05<br>- | AACAGCTATGACCATGtcccatcccatcttgtc (SEQ ID<br>N° 13)     | 3689          | 3671        | 35                       |                          |              |

| Nome       | Seqüência de Primers                                      | Nt      | Nt    | Comprimento | Comprimento | Superposição |
|------------|-----------------------------------------------------------|---------|-------|-------------|-------------|--------------|
|            |                                                           | Inicial | Final | do Primer   | do RT-PCR   |              |
| D1 06<br>+ | GTTTTCCAGTCACGACgga aatcagaccagtaaggag<br>(SEQ ID N° 14)  | 3418    | 3439  | 39          | 913         | 233          |
| D1 06<br>- | AACAGCTATGACCATGgttggtgaggcaccagag<br>(SEQ ID N° 15)      | 4349    | 4330  | 36          |             |              |
| D1 07<br>+ | GTTTTCCAGTCACGACgcaa accactaacatgttgc<br>(SEQ ID N° 16)   | 4077    | 4097  | 38          | 901         | 259          |
| D1 07<br>- | AACAGCTATGACCATGccactgtgtgcaccactc (SEQ<br>ID N° 17)      | 4995    | 4977  | 35          |             |              |
| D1 08<br>+ | GTTTTCCAGTCACGACccaagggaagagactggaac<br>(SEQ ID N° 18)    | 4699    | 4718  | 37          | 908         | 210          |
| D1 08<br>- | AACAGCTATGACCATGtctgatttgatgcttgaac (SEQ<br>ID N° 19)     | 5626    | 5606  | 37          |             |              |
| D1 09<br>+ | GTTTTCCAGTCACGACaagcacattttaccgatccag<br>(SEQ ID N° 20)   | 5376    | 5396  | 38          | 900         | 182          |
| D1 09<br>- | AACAGCTATGACCATGgtcgtagtttcttcttctccttc<br>(SEQ ID N° 21) | 6299    | 6275  | 41          |             |              |
| D1 10<br>+ | GTTTTCCAGTCACGACgcaatagacggggaatcacg<br>(SEQ ID N° 22)    | 6074    | 6093  | 37          | 809         | 138          |
| D1 10<br>- | AACAGCTATGACCATGatgatggtggttttcagcag (SEQ<br>ID N° 23)    | 6901    | 6882  | 36          |             |              |

| Nome       | Seqüência de Primers                                      | Nt<br>Inicial | Nt<br>Final | Comprimento<br>do Primer | Comprimento<br>do RT-PCR | Superposição |
|------------|-----------------------------------------------------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| D1 11<br>+ | GTTTTCCCAGTCACGACgtgttgcttattccagagcc<br>(SEQ ID N° 24)   | 6725          | 6744        | 37                       | 877                      |              |
| D1 11<br>- | AACAGCTATGACCATGgctgtcttttccattttctcc (SEQ<br>ID N° 25)   | 7622          | 7601        | 38                       |                          | 228          |
| D1 12<br>+ | GTTTTCCCAGTCACGACactttgcacatcacagatcc<br>(SEQ ID N° 26)   | 7354          | 7373        | 37                       | 821                      |              |
| D1 12<br>- | AACAGCTATGACCATGttcgcactagcattctctcc (SEQ<br>ID N° 27)    | 8192          | 8174        | 35                       |                          | 175          |
| D1 13<br>+ | GTTTTCCCAGTCACGACcacctgagaaatlgacacc<br>(SEQ ID N° 28)    | 7980          | 7999        | 37                       | 907                      |              |
| D1 13<br>- | AACAGCTATGACCATGtttccttggttatgaagctccc (SEQ<br>ID N° 29)  | 8907          | 8886        | 38                       |                          | 207          |
| D1 14<br>+ | GTTTTCCCAGTCACGACcaaaagcgaacaggacac<br>(SEQ ID N° 30)     | 8661          | 8679        | 36                       | 894                      |              |
| D1 14<br>- | AACAGCTATGACCATGgtttcaccacacagtcattctcc<br>(SEQ ID N° 31) | 9575          | 9554        | 38                       |                          | 221          |
| D1 15<br>+ | GTTTTCCCAGTCACGACagaccagcgaaaaatggaac<br>(SEQ ID N° 32)   | 9314          | 9333        | 37                       | 865                      |              |
| D1 15<br>- | AACAGCTATGACCATGtcccaatgagccttctcac (SEQ<br>ID N° 33)     | 10196         | 10178       | 35                       |                          | 262          |

| Nome        | Seqüência de Primers                                     | Nt      | Nt    | Comprimento | Comprimento | Superposição |
|-------------|----------------------------------------------------------|---------|-------|-------------|-------------|--------------|
|             |                                                          | Inicial | Final | do Primer   | do RT-PCR   |              |
| D1 16<br>+  | GTTTTCCCAGTCACGACgctaatgctatctgttcagcc<br>(SEQ ID N° 34) | 9896    | 9916  | 38          | 812         | -28          |
| D1 16<br>-  | AACAGCTATGACCATGtgattcaacagcaccattcc (SEQ<br>ID N° 35)   | 10726   | 10707 | 36          |             |              |
| D1<br>16i + | Ccatggaagctgtacgc (SEQ ID N° 36)                         | 10480   | 10496 | 17          |             |              |
| D1<br>16i - | gagacagcaggatctctgg (SEQ ID N° 37)                       | 10671   | 10652 | 19          |             |              |

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL**

A partir de experiências anteriores, um mínimo de 1000 DICC<sub>50</sub> é necessário para obter uma reação de RT-PCR positiva nas próximas etapas. Isto significa que um título mínimo de 10<sup>4</sup> DICC<sub>50</sub>/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 carregados 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 (Tabela 1). 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 1. As condições de PCR foram as seguintes:

| RT                 | 2µl        | Programa de PCR |      |        |              |
|--------------------|------------|-----------------|------|--------|--------------|
| Tampão 10x         | 2.5µl      | Desnaturação    | 94°C | 2 min  | 40<br>ciclos |
| dNTP mix<br>(10mM) | 2µl        | Desnaturação    | 94°C | 15 seg |              |
| Primers            | 0.8µl cada | Hibridização    | 55°C | 30 seg |              |
| H <sub>2</sub> 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 independente em uma única reação. As reações foram carregadas em um seqüenciamento em gel de eletroforese. 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 | Programa de PCR |      |        |              |
|------------------|----------------|-----------------|------|--------|--------------|
| Tampão de Reação | 7.2µl          | Desnaturação    | 92°C | 2 min  | 30<br>ciclos |
| Primers (1-2 pM) | 1.5µl cada     | Desnaturação    | 92°C | 15 seg |              |
| Enzima           | 1µl            | Hibridização    | 50°C | 30 seg |              |
| H <sub>2</sub> 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 de varredura  | 3      |

### **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:

5                   5' primers: M13SEQ-GTTTTCCCAGTCACGAC (SEQ ID N° 38)

3' primers: M13REV-AACAGCTATGACCATG (SEQ ID N° 39)

Seqüências M13-SEQ e REV correspondem aos primers de motivo M13 universal (New England Biolabs references).

10                   Para o contíguo de montagem, uma rápida análise foi realizada no Vector NTi, no módulo ContigExpress (Informax). A seqüência referência da cepa LAV1 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  
15                   o alinhamento genômico.

#### **2.3.1 MONTAGEM DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DE VDV1**

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  
20                   construir o alinhamento global. Todos os resultados foram alinhados a seqüência juntamente com a seqüência referência de LAV1, 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 VDV1 é demonstrada na SEQ ID N° 1.

25                   Algumas ambigüidades são freqüentemente encontrados 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 não estas não foram confirmadas por pelo menos 5 duas outras seqüências independentes de PCR de consenso compatível. Inversamente, qualquer discrepância confirmada em duas seqüências independente foram mantidas no último seqüenciamento.

A Tabela 4 sumariza as características de cada reação de seqüenciamento, indicando o início, fim e a duração. As sobreposições entre 10 PCR adjacentes também estão indicados, assim como as diferenças em relação à seqüência de referência na última coluna.

**TABELA 4 CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DO**

**VÍRUS DA DENGUE VDV1**

| Nome    | Início | Fim  | Tamanho | Superposição | Comentários             |
|---------|--------|------|---------|--------------|-------------------------|
| D1 01 + | 35     | 921  | 886     | 0            |                         |
| D1 01 - | 899    | 33   | 866     | 209          |                         |
| D1 02 + | 712    | 1596 | 884     |              |                         |
| D1 02 - | 1569   | 713  | 856     | 196          |                         |
| D1 03 + | 1415   | 2277 | 862     |              |                         |
| D1 03 - | 2253   | 1400 | 853     | 160          |                         |
| D1 04 + | 2133   | 3027 | 894     |              | 2719 G>A<br>(NS1-100 s) |

| Nome    | Início | Fim  | Tamanho | Superposição | Comentários                                   |
|---------|--------|------|---------|--------------|-----------------------------------------------|
| D1 04 - | 3000   | 2117 | 883     | 212          | 2719 G>A<br>(NS1-100 s)                       |
| D1 05 + | 2834   | 3681 | 847     |              |                                               |
| D1 05 - | 3654   | 2815 | 839     | 247          |                                               |
| D1 06 + | 3451   | 4332 | 881     |              |                                               |
| D1 06 - | 4325   | 3434 | 891     | 243          |                                               |
| D1 07 + | 4113   | 4987 | 874     |              |                                               |
| D1 07 - | 4961   | 4089 | 872     | 245          |                                               |
| D1 08 + | 4742   | 5564 | 822     |              |                                               |
| D1 08 - | 5583   | 4742 | 841     | 183          |                                               |
| D1 09 + | 5400   | 5916 | 516     |              |                                               |
| D1 09 - | 6274   | 5758 | 516     | 197          | 5962 C>A<br>(NS3-481<br>N>K); 2<br>seqüências |
| D1 10 + | 6114   | 6868 | 754     |              |                                               |
| D1 10 - | 6883   | 6077 | 786     | 135          |                                               |
| D1 11 + | 6761   | 7504 | 743     |              |                                               |

| Nome     | Início | Fim   | Tamanho | Superposição | Comentários               |
|----------|--------|-------|---------|--------------|---------------------------|
| D1 11 -  | 7597   | 6733  | 864     | 217          |                           |
| D1 12 +  | 7381   | 8034  | 653     |              | 7947 A>G<br>(NS5-125 K>R) |
| D1 12 -  | 8143   | 7380  | 763     | 141          | 7947 A>G<br>(NS5-125 K>R) |
| D1 13 +  | 8003   | 9730  | 727     |              |                           |
| D1 13 -  | 8857   | 8002  | 855     | 182          |                           |
| D1 14 +  | 8687   | 9472  | 785     |              |                           |
| D1 14 -  | 9544   | 8675  | 869     | 200          |                           |
| D1 15 +  | 9344   | 10170 | 826     |              |                           |
| D1 15 -  | 10162  | 9399  | 763     | 253          |                           |
| D1 16 +  | 9917   | 10261 | 344     |              | 2 seqüências              |
| D1 16 -  | 10706  | 10394 | 312     | 0            |                           |
| D1 16i+  | 10500  | 10706 | 206     |              |                           |
| D1 16i - | 10649  | 10204 | 455     |              |                           |

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). As duas extremidades do genoma não poderiam ser distinguidas de todas as outras amplificações por PCR. Portanto, no genoma reconstruído (SEQ ID N° 1), 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 34. No 3' terminal, é a seqüência dos nucleotídeos de 10707 a 10735.

### **2.3.2 COMPARAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS**

A comparação direta da seqüência entre as cepas VDV1 e LAV1 de referência mostra uma série de 3 diferenças de nucleotídeos. A Tabela 5 mostra a lista completa dessas posições.

**TABELA 5: COMPARAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS ENTRE AS CEPAS LAV1 E VDV1.**

| Nucleotídeos  |      |      | Aminoácidos |               |      |     | Nota       |
|---------------|------|------|-------------|---------------|------|-----|------------|
| Posição do Nt | LAV1 | VDV1 | Região      | Posição do AA | LAV1 | VDV |            |
| 2719          | G    | A    | NS1         | 100           | G    | G   | Silencioso |
| 5962          | C    | A    | NS3         | 481           | N    | K   |            |
| 7947          | A    | G    | NS5         | 125           | K    | R   |            |

A mudança de nucleotídeo na posição 2719 é silenciosa no nível do aminoácido. A segunda diferença na posição 5962 desencadeia

uma mudança de aminoácido NS3-481 (lisina para aspargina). Ambos são hidrofílicos, mas lisina é carregada positivamente, enquanto que a aspargina não é. A última diferença está localizado no peptídeo NS5, substituindo lisina por arginina na posição NS5-125. Tais substituições de aminoácidos são relativamente conservadoras do ponto de vista químico, tanto os resíduos de arginina quanto de lisina são hidrofílicas e carregadas positivamente.

**TABELA 6: PESQUISA DE DISCREPÂNCIAS SOBRE OUTRAS CEPAS DE DENGUE-1**

| Posição do Nucleotídeo na cepa VDV1 | Número de cepas que compartilham o mesmo nucleotídeo |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 2719                                | 24/40                                                |
| 5962                                | 6/40                                                 |
| 7947                                | 1/40                                                 |

Ao realizar o alinhamento da seqüência entre todos as seqüências genômicas do sorotipo-1 da dengue disponíveis no Genbank, parece que, a maior parte das diferenças identificadas também estão presentes em outras cepas (vide Tabela 6). Uma posição é única na cepa VDV1 (posição 7947; NS5 - 125).

Assim, a seqüência genômica completa da cepa VDV1 do vírus da dengue foi estabelecida.

Três diferenças de nucleotídeos foram detectadas em relação à seqüência genômica LAV1 de origem. A cepa VDV1 vacinal é derivada da LAV1, através da "sanitização" viral e da passagem de células de cão para células de macaco.

As diferenças entre LAV1 e VDV1 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 no LAV1. Em segundo lugar, LAV1 foi produzida em células PDK, enquanto VDV1 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 o que a DNA polimerase.

- 5 Em termos de seqüências apenas 3 diferenças entre LAV1 e VDV1 foram observadas, o que corresponde a apenas 2 substituições de aminoácidos. Todos 14 posições de nucleotídeos que foram associadas a atenuação viral do LAV1 estão conservadas no VDV1. Além disso, a seqüências da cepa VDV1 “mãe” e “em massa” foram comparadas (Tabela 7).

10 **TABELA 7: DIFERENÇAS DE NUCLEOTÍDEOS ENTRE A CEPA 16007 DO VÍRUS DA DENGUE-1 TIPO SELVAGEM E AS CEPAS LAV1/PDK13 E VDV1 ATENUADAS.**

| Vírus               | 1323/E-130 | 1541-3/E-203 | 1545/E-204 | 1567/E-211 | 1608/E-225 | 2363/E-477 | 2695/NS1-92 | 2719/NS1-100 | 2782/NS1-121 | 5063/NS3-182 | 5962/NS3-481 | 6048/NS3-510 | 6806/NS4a-144 | 7330/NS4b-168 | 7947/NS5-125 | 9445/NS5-624 |
|---------------------|------------|--------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| DEN-1<br>16007      | T<br>Val   | GaA<br>Glu   | G<br>Arg   | A<br>Gln   | C<br>Ser   | A<br>Met   | T<br>Asp    | G<br>Gly     | C<br>Ala     | G<br>Glu     | C<br>Asn     | A<br>Tyr     | A<br>Met      | A<br>Gln      | A<br>Lys     | C<br>Ser     |
| LAV1/<br>PDK13      | C<br>Ala   | AaG<br>Lys   | A<br>Lys   | G<br>Gln   | T<br>Leu   | G<br>Val   | C<br>Asp    | G<br>Gly     | T<br>Ala     | A<br>Lys     | C<br>Asn     | T<br>Tyr     | G<br>Val      | G<br>Gln      | A<br>Lys     | T<br>Ser     |
| VDV1<br>mãe         | C<br>Ala   | AaG<br>Lys   | A<br>Lys   | G<br>Gln   | T<br>Leu   | G<br>Val   | C<br>Asp    | A<br>Gly     | T<br>Ala     | A<br>Lys     | A<br>Lys     | T<br>Tyr     | G<br>Val      | G<br>Gln      | G<br>Arg     | T<br>Ser     |
| VDV1<br>em<br>massa | C<br>Ala   | AaG<br>Lys   | A<br>Lys   | G<br>Gln   | T<br>Leu   | G<br>Val   | C<br>Asp    | A<br>Gly     | T<br>Ala     | A<br>Lys     | A<br>Lys     | T<br>Tyr     | G<br>Val      | G<br>Gln      | G<br>Arg     | T<br>Ser     |

A seqüência completa da matriz inicial semente mãe da VDV1 foi alinhada com a seqüência em massa. Nenhuma diferença entre as duas seqüências foi observada, indicando estabilidade genética através de

passagens.

VDV1 mostra uma notável estabilidade genética no que diz respeito à seu progenitor LAV1.

### EXEMPLO 3

5

#### CARACTERIZAÇÃO

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".

Resumidamente, após 2 passagens sucessivas da semente pré-mãe em células Vero cedida pelo Departamento de Pesquisa, as respectivas sementes de trabalho 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 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 0,22 µm e então diluída na dose desejada dentro da mesma solução. A substância ativa é, então, colocada em frascos de vidro, congeladas à seco, e armazenada antes de ser utilizada.

#### 3.1 MARCADORES FENOTÍPICOS

Os resultados são apresentados na Tabela 8. Os testes de validação realizados para a semente mãe e semente em massa são:

Tamanho da Placa: O ensaio foi realizado em células Vero a 37 °C, após 7 dias de incubação. A classificação por tamanho das placas foi realizada pelo software dedicado Saisam v.5.2.0 (Microvision Instruments),

após a captação da imagem com uma câmera de vídeo. Duas populações (0,3 mm e 0,8 mm) foram detectadas na LAV1. A maior população foi a de tamanho menor. Após a adaptação às células Vero e a clonagem biológica, o tamanho das placas VDV1 mostrou-se de distribuição homogênea, com mais de 98% da população mostrando um único pico, centrado em 0,8 mm de diâmetro. Estas placas são claramente distintas das obtidas com o vírus DEN-1 16007 (vide figuras 4 e 5).

Sensibilidade à temperatura: o monovalente 1 exibe clara restrição de crescimento a 39 °C comparado as não-sensíveis à temperatura (Ts), tipo selvagem (WT) D1-16007. Isto foi demonstrado tanto por ensaios de titulação de infecção quanto por quantificação de RNA viral. A passagem 18, “mãe” e “em massa”, (10 passagens após a passagem em massa) das sementes monovalentes 1 exibiram 90% ou mais de redução no título a 39 °C, comparado a 37 °C.

**TABELA 8: RESUMO DOS FENÓTIPOS VIRAIS DE DEN-1**

| Vírus    | Pontos | Sensibilidade à Temperatura<br>(Percentual de redução de título a 39°C) <sub>vezes de</sub><br>redução |                      |                      |                       | Neurovirulência em<br>camundongos suíços albinos<br>recém-nascidos |            |
|----------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|------------|
|          |        | Dia 3                                                                                                  | Dia 4                | Dia 5                | Dia 6                 | Mortalidade                                                        | AST (S.D.) |
| D1-16007 | -      | 62.1 <sub>2.6</sub>                                                                                    | 59.3 <sub>2.5</sub>  | 56.3 <sub>2.3</sub>  | (-28.5.<br>1.4)       | 6.25% <sub>16</sub>                                                | 19.0 (0.0) |
| D1-PDK13 | +      | 87.1 <sub>7.8</sub>                                                                                    | 91.3 <sub>11.5</sub> | 95.5 <sub>22.2</sub> | 96.5 <sub>28.6</sub>  | 0.00% <sub>16</sub>                                                | n.a.       |
| VDV1 MS  | +      | 97.2 <sub>35.7</sub>                                                                                   | 97.7 <sub>43.5</sub> | 98.8 <sub>83.3</sub> | 99.5 <sub>200.0</sub> | 0.00% <sub>16</sub>                                                | n.a.       |

\*n: número de animais

### **3.2 MARCADORES FENOTÍPICOS**

A vacina VDV1 pode distinguir-se das cepas precursoras ao nível genômico. A atenuação loci específicas foi identificada. Estes loci estão conservados nas matrizes iniciais semente mãe e semente em massa

#### **EXEMPLO 4**

#### **IMUNOGENICIDADE, VIREMIA, E TOXICOLOGIA EM MACACOS**

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 9: 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)**

| <b>Duração média da viremia<br/>(Dias)<br/>(Todos os sorotipos sendo<br/>considerados)</b> | <b>Pico médio do título da<br/>Viremia<br/>(log 10 pfu)<br/>(Todos os sorotipos sendo<br/>considerados)</b> | <b>Título Médio Neutralizante<br/>Dia 30<br/>(para cada sorotipo)<br/>PRNT 50</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| $\leq 3$ dias                                                                              | $\leq 1.5-2$                                                                                                | $\geq 80$                                                                         |

20 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 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1.1 EXPERIMENTOS EM MACACOS**

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

5 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  
10 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  
15 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.

### **4.1.2 VIREMIA E RESPOSTAS POR ANTICORPOS NEUTRALIZANTES (TESTE DE**

#### **NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS, PRNT)**

20 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  
25 1:5 do soro foi realizada. As diluições de 1:5 do soro foram inativadas por 30 minutos a 56 °C antes do teste de neutralização do anticorpo.

#### **4.1.2.1 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-16007 PDK-13 (LAV1) foram plaqueadas.

#### 10 **4.1.2.2 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 16007) 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% (PRNT<sub>50</sub>) e 70% (PRNT<sub>70</sub>) 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.

## **4.2 AVALIAÇÃO DOS VDV CANDIDATOS**

### **4.2.1 VDV-1/pré-mãe**

A purificação/seleção do candidato D1 foi realizado conforme descrito no exemplo 1. Os clones selecionados (com base nas seqüência e marcadores fenotípicos) foram testados na sanofi pasteur como descrito em Material e Métodos (Biotério Marcy l'Etoile, I15), 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 forma líquida, foram mantidos a -70 °C.

LAV1: título:  $10^{3,9}$  DICC<sub>50</sub>/ml, liofilizado, ressuspendido em 0,5 ml de PBS (contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,133 g/L.; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,1g/L) e administrado na totalidade.

VDV1 pré-mãe: DEN1-TV111: Título:  $10^{5,9}$  DICC<sub>50</sub>/ml, líquido, diluído em  $10^{5,3}$  pfu/ml em PBS (contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,133 g/L, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>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  $10^5$  DICC<sub>50</sub> para VDV1.

Os resultados estão apresentados na Tabela 10. Titulações no dia 28 foram realizadas em triplicata (PRNT<sub>70</sub>) ou em duplicata (PRNT<sub>50</sub>).

**TABELA 10: IMUNOGENICIDADE DO VDV1 PRÉ-MÃE**

| AvP monovalente VDV1 (Exp A) Estudo em Macacos DEN (F. MI.DEN003.Si): PRNT e Resultados da Viremia |       |                                      |                    |                    |                    |                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                                                                                    |       | Título dos Anticorpos Neutralizantes |                    |                    |                    | Viremia (PFU/ml em células Vero) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Soro                                                                                               | Grupo | Dia (-15)                            |                    | Dia 28             |                    | Dia                              | Dia | Dia | Dia | Dia | Dia | Dia | Dia | Dia | Dia |
|                                                                                                    |       | PRNT <sub>70</sub>                   | PRNT <sub>50</sub> | PRNT <sub>70</sub> | PRNT <sub>50</sub> | 5                                | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |

| AvP monovalente VDV1 (Exp A) Estudo em Macacos DEN (F. Mi.DEN003.Si): PRNT e Resultados da Viremia |        |                                      |        |         |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------------------|---|---|---|---|---|----|---|----|-----|
|                                                                                                    |        | Título dos Anticorpos Neutralizantes |        |         |        | Viremia (PFU/ml em células Vero) |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AD                                                                                                 | LAV    | <10/<10                              | <10    | 320/16  | 160/32 | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 0  | 0   |
| 333                                                                                                | DEN-1  |                                      |        | 0/160   | 0      |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AC                                                                                                 |        | <10/<10                              | <10    | 640/64  | 1280/1 | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 50 | 150 |
| 763                                                                                                |        |                                      |        | 0/640   | 280    |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AD                                                                                                 |        | <10/<10                              | <10    | 320/16  | 160/32 | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 0  | 0   |
| 209                                                                                                |        |                                      |        | 0/160   | 0      |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AC                                                                                                 |        | <10/<10                              | <10    | 160/80/ | 160/16 | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0  | 0   |
| 755                                                                                                |        |                                      |        | 160     | 0      |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
|                                                                                                    |        |                                      |        |         |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AC                                                                                                 | VDV    | <10/<10                              | <10    | 160/80/ | 160/16 | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 0  | 0   |
| 775                                                                                                | DEN-1  |                                      |        | 80      | 0      |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AC                                                                                                 | TV111  | <10/<10                              | <10    | 20/10/1 | 20/20  | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 0  | 0   |
| 881                                                                                                |        |                                      |        | 0       |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AD                                                                                                 |        | <10/<10                              | <10    | 320/80/ | 160/80 | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 0  | 0   |
| 145                                                                                                |        |                                      |        | 80      |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| AD                                                                                                 |        | <10/<10                              | <10    | 20/10/1 | 20/20  | 0                                | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 0  | 0   |
| 113                                                                                                |        |                                      |        | 0       |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
|                                                                                                    |        |                                      |        |         |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| Vírus                                                                                              | Exp#1  | Exp#2                                | Exp#3  |         |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |
| DEN-1                                                                                              | 112PFU | 45PFU                                | 101PFU |         |        |                                  |   |   |   |   |   |    |   |    |     |

Resumidamente, as respostas foram bastante homogêneas dentro de cada grupo, e algumas tendências claras puderam ser identificadas para cada construção. Não foram encontradas diferenças discrepantes entre VDV1 e LAV1: viremia baixa e tardia foi observada em alguns macacos LAV1.



[illegible]

| Estudo em macacos(F.MI.DEN004.Mk) : VDV1 Monovalente e Tetravalente |                                                                 |                                        |                     |                     |                     |                                  |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|
|                                                                     |                                                                 | Títulos para Anticorpos Neutralizantes |                     |                     |                     | Viremia (PFU/ml em células Vero) |
| Média                                                               | Resposta<br><br>contra<br><br>os<br><br>quarto<br><br>sorotipos | -/-1.2/3                               | -/-1/1              | 2/-<br><br>/1.2/1.6 | -/-/-/-             |                                  |
|                                                                     |                                                                 | D1/D2/<br><br>D3/D4                    | D1/D2/<br><br>D3/D4 | D1/D2/<br><br>D3/D4 | D1/D2/D<br><br>3/D4 |                                  |

### **4.3 TESTES DE NEUROVIRULÊNCIA EM MACACOS**

Para cada tipo de vírus, 10 macacos cinomolgo das ilhas Maurício foram inoculadas com semente mãe da VDV1 pela via intracerebral ( $10^{7.23}$  CCID<sub>50</sub>/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.

Nenhum sinal histopatológico de patogenicidade foi observado no cérebro dos macacos injetados com VDV1 mãe.

### **EXEMPLO 5**

#### **SEGURANÇA DO VDV1 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 VDV1 monovalente em uma concentração de vírus de  $10^4$  CCID<sub>50</sub> comparado com Stamaril® (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

5 precaução da segurança, são realizadas no estudo inclusões seqüenciais.

O registro e as vacinações são então escalonados; um 1º coorte (n = 4 por grupo, n total = 12) foram vacinados. 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

10 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 representação esquemática do desenho do estudo é fornecida na figura 6.

Após a administração da vacina o paciente são regularmente submetidos a vários testes e exames clínicos. Um resumo deste seguimento é

15 indicado na tabela 12 abaixo.

A população incluída é constituída de adultos com idades 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) (pessoas apresentando vacinação contra

20 doenças causadas por flavivirus (por exemplo, febre amarela, encefalite japonesa, dengue); ou história de infecção por flavivirus (confirmado clinicamente, sorologicamente ou microbiologicamente) ou residir previamente ou viajar para áreas com elevada endemicidade de infecção por dengue (independentemente da duração), ou ter residência ou viajar para o norte de

25 Queensland durante 2 semanas ou mais) foram excluídos)

**TABELA 12: 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 |

| 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            | √   |     |     |     |     |     |      |     | √    | √   | √    | √    |
| -Citocinas no soro          | √   | √   | √   | √   | √   | √   | √    | √   | √    | √   |      |      |
| -PBMCs de células T         | √   |     |     |     |     |     |      |     |      | √   |      |      |
| (subconjunto)               | √   |     |     |     |     |     |      |     |      | √   |      |      |
| - Vigilância realizada      |     |     |     |     |     |     |      |     |      |     |      |      |
| Eventos Locais & sistêmicos | √   |     |     |     |     |     |      |     |      |     |      |      |
|                             | √   | √   | √   | √   | √   | √   | √    | √   | √    | √   | √    | √    |

V: visita - D: dia

O 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 caso que o critério de exclusão temporária é cumprido). V06 e V07

5 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:

10 - Ingrediente ativo:  $4 \pm 0.5 \log_{10}$  CCID<sub>50</sub> de cada vírus da dengue monovalente sorotipo-1 (VDV1) 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% de VDV monovalentes VDV1, deve ser usada imediatamente ou ser mantidas entre +2 °C e +8 °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 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 da febre amarela vivo atenuado (cepa 17D): Dose letal em camundongo 50% (DL<sub>50</sub>) ≥ 1000/Diluente: solução de NaCl 4 % estéril).

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

Os resultados preliminares do estudo são indicados na Tabela 13 abaixo.

**TABELA 13: DADOS PRELIMINARES DE SEGURANÇA**

|                     | Dia<br>0 | Dia<br>1 | Dia<br>2 | Dia<br>3 | Dia<br>4 | Dia<br>5 | Dia<br>6 | Dia<br>7 | Dia<br>8 | Dia<br>9 | Dia<br>10 | Dia<br>11 | Dia<br>12 | Dia<br>13 |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| LOCAL<br>SOLICITADO |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Dor                 | 1        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Eritema             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Enrijecimento       |          |          |          |          |          |          |          |          | 1        |          |           |           |           |           |

|                         | Dia<br>0 | Dia<br>1 | Dia<br>2 | Dia<br>3 | Dia<br>4 | Dia<br>5 | Dia<br>6 | Dia<br>7 | Dia<br>8 | Dia<br>9 | Dia<br>10 | Dia<br>11 | Dia<br>12 | Dia<br>13 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Edema                   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| LOCAL NÃO<br>SOLICITADO |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Equimose                |          | 1        | 1        |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Prurido                 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| OUTROS<br>SOLICITADOS   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Temp $\geq 37.5$ C      |          |          | 1        |          |          | 1        |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Severidade              |          |          | 1        | 1        |          |          |          |          | 1        |          |           |           |           |           |
| Mal-estar               |          | 2        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        |          |           | 2         | 1         | 2         |
| Astenia                 |          | 1        | 2        | 1        | 1        | 2        | 1        |          | 1        |          |           | 2         | 1         | 1         |
| Anorexia                |          |          | 1        | 1        | 1        |          |          |          |          |          |           | 1         | 1         | 1         |
| Náusea                  |          | 1        | 2        | 1        |          | 1        | 1        |          | 1        |          |           | 1         | 1         | 2         |
| Vômito                  |          |          | 1        | 1        |          | 1        | 1        |          |          |          |           | 1         | 1         |           |
| Dor de estômago         | 1        | 1        | 2        | 2        | 1        | 1        | 1        |          | 1        |          |           | 1         | 1         | 1         |
| Dor de cabeça           | 2        | 1        | 2        | 2        |          | 1        | 1        | 1        | 2        | 1        |           | 1         | 1         | 1         |
| Mialgia                 |          |          | 1        | 1        |          | 1        |          |          |          |          |           | 1         | 1         | 2         |
| Artralgia               |          |          | 1        | 1        |          | 1        | 1        |          |          |          |           | 1         | 1         | 1         |
| Fotofobia               |          |          |          |          |          |          | 1        | 1        |          |          |           | 1         |           |           |
| Conjuntivite            |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| Dor nos olhos           |          |          |          |          |          |          | 1        | 1        |          |          |           |           |           |           |

[illegible]

|                        | Dia<br>0 | Dia<br>1 | Dia<br>2 | Dia<br>3 | Dia<br>4 | Dia<br>5 | Dia<br>6 | Dia<br>7 | Dia<br>8 | Dia<br>9 | Dia<br>10 | Dia<br>11 | Dia<br>12 | Dia<br>13 |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Diarréia               |          | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        |          |          |          |          | 1         | 1         | 1         | 1         |
| Dor de garganta        |          |          |          | 1        |          |          |          |          |          |          |           |           |           | 1         |
| Tosse                  |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           | 1         |
| Menstruação<br>precoce |          |          |          |          |          |          |          |          | 1        |          |           |           |           |           |
| Fatiga                 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 1         |           |           |           |

A Tabela 13 mostra que anormalidades biológicas (reduções de WCC, diminuição na contagem de plaquetas) foram brandas. Os sintomas foram principalmente mal-estar, náuseas, diarreia e vômitos ocasionais. Eles foram de gravidade moderada. Uma erupção cutânea significativa típica de erupção cutânea maculopapular "viral" se iniciou no dia 12, 90% de acometimento.

A segurança dos dados da segunda coorte também foi satisfatória, sem nenhuma anormalidade biológica registrada. Todos os indivíduos apresentam uma resposta de anticorpos 28 dias após a vacinação contra a dengue-1 (título entre 1315 e 13150).

#### REFERÊNCIAS

- Bhamarapravati, N e Yoksan S. (1997). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Live attenuated tetravalent dengue vaccines, CABI Publishing, 367-379.
- DeFraités RF, Smoak BL, Trofa AF, Hoke CH, Kanessa-athan N, King A, MacArthy PO, *et al.* Dengue fever among U.S. military personnel - Haiti, September-November, 1994. MMWR 1994; 43: 845-848.
- Dunnen and 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, editor, Boca Raton (FL): CRC Press:223-60

5 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

10 Huang *et al.* (2000). *J. Virol* 74; 3020-3028.

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

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

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

20 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

25 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, and 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.

- 5 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.

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

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.

```

<110> Sanofi Pasteur
Centers for Disease Control and Prevention
<120> Cepa Atenuada do Vírus da Dengue Sorotipo 1
<130> BET 06P0285
<150> US 60/691.243
<151> 17-06-2005
<160> 44
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 10735
<212> DNA
<213> Vírus da Dengue

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10654)
<223> VDV1

<400> 1
agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag      60
ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgatc aaccaacgaa aaaagacggg      120
tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt      180
ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaagga cccatgaaat tgggtgatggc      240
tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggctagatg      300
gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg ggtttcaaga gagaaatctc      360
aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct      420
gcccacagcc ctggcgttcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag      480
caagcaggaa agaggaaagt cacttttggt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac      540
cctcattgctg atggatttgg gagagtgtg tgaggacacg atgacctaca aatgcccccg      600
gatcactgag gcggaaccag atgacgttga ctgttggtgc aatgccacgg acacatgggt      660
gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt      720
ggccccacac gtggggcctg gcctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg      780
tgcttggaag cagatacaaa aagtagagac ttgggctctg agacatccag gattcacggt      840
gatagccctt tttctagcac atgccatagg aacatccatc acccagaaag ggatcatttt      900
cattttgctg atgctggtta 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 | acaaaactag | aaggaaagat  | 1320 |
| agctcaatat  | gaaaacctaa  | aatattcagt | gatagtcacc | gtccacactg | gagatcagca  | 1380 |
| ccagggtggga | aatgagacta  | cagaacatgg | aacaactgca | accataacac | ctcaagctcc  | 1440 |
| tacgtcggaa  | atacagctga  | ccgactacgg | aacccttaca | ttagattgtt | cacctaggac  | 1500 |
| agggctagat  | tttaacgaga  | tggtgttgct | gacaatgaaa | aagaaatcat | ggcttgtcca  | 1560 |
| caaacagtgg  | tttctagact  | taccactgcc | ttggacctct | ggggctttaa | catcccaaga  | 1620 |
| gacttggAAC  | 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 | 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  | gccattctgg  | gagacaccgc | atgggacttc | ggttctatag | gaggagtgtt  | 2220 |
| cacgtctatg  | ggaaaactgg  | tacaccaggt | ttttggaact | gcatatggag | ttttgtttag  | 2280 |
| cggagtcttct | 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 | aatacaaatt  | 2520 |
| ccaggctgac  | tcccccaaga  | gactatcagc | agccattggg | aaggcatggg | aggaggggtg  | 2580 |
| gtgtggaatc  | cgatcagcca  | ctcgtctcga | gaacatcatg | tggaaacaaa | tatcaaatga  | 2640 |
| attgaaccac  | atcctacttg  | aaaatgacat | gaaatttaca | gtggtcgtgg | gagacgttag  | 2700 |
| tggaatcttg  | gccaagggaa  | aaaaaatgat | taggccacaa | cccatggaac | acaaatactc  | 2760 |
| gtggaaaagc  | tggggaaaag  | ctaaaatcat | aggagcggat | gtacagaaca | ccaccttcac  | 2820 |
| catcgacggc  | ccaaacaccc  | cagaatgccc | tgacaatcaa | agagcatgga | atatttggga  | 2880 |
| agtagaggac  | tatggatttg  | ggattttcac | gacaaacata | tggttgaaat | tgctgtgactc | 2940 |
| ctacacccaa  | gtatgtgacc  | accggctgat | gtcagctgcc | attaaggaca | gcaaggcagt  | 3000 |
| ccatgctgac  | atgggggtact | ggatagaaag | tgaaaagaac | gagacatgga | agttggcgag  | 3060 |
| agcctccttt  | atagaagtta  | agacatgcat | ctggccaaaa | tcccacactc | tatggagcaa  | 3120 |
| tggagtctctg | gaaagtgaaa  | tgataattcc | aaagatatat | ggaggaccaa | tatctcagca  | 3180 |
| caactacaga  | ccaggatatt  | tcacacaaac | agcagggccg | tggcacctag | gcaagttgga  | 3240 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| actagatttc gatttttgtg aaggtaccac agttgttgtg gatgaacatt gtggaaatcg  | 3300 |
| aggac'catct ctcagaacca caacagtcac aggaaagata atccatgaat ggtgctgcag | 3360 |
| atcttgtacg ctaccccccc tacgtttcaa aggggaagac ggggtgttggc acggcatgga | 3420 |
| aatcagacca gtgaaggaca aggaagagaa cctgggtcaag tcaatggtct ctgcagggtc | 3480 |
| aggagaagtg gacagctttt cactaggact gctatgcata tcaataatga ttgaagaagt  | 3540 |
| gatgagatcc agatggagca aaaaaatgct gatgactgga aacttggtctg tggtcctcct | 3600 |
| tcttataatg ggacaattga catggagtga tctgatcagg ttatgtatta tgggtggagc  | 3660 |
| caacgcttca gacaagatgg ggatgggaac aacgtaccta gctttaatgg ccactttcaa  | 3720 |
| aatgagacca atgttcgccg tcgggctatt atttcgcaga ctaacatcta gagaagttct  | 3780 |
| tcttcttaca attggcttga gcctgggtggc atccgtggag ctaccaagtt ccctagagga | 3840 |
| gctgggggat ggacttgcaa taggcatcat gatgttgaat 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 gaaagcggtc 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 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 agcggaactt acgttagtgc catagctcaa gctaaggcat cacaagaagg  | 5040 |
| gcctctacca gagattgagg acaaggtgtt taggaaaaga aacttaacaa taatggacct  | 5100 |
| acatccagga tcgggaaaaa caagaagata ccttcagcc atagtccgtg aggccataaa   | 5160 |
| aaggaagctg cgcacgctaa tcctagctcc cacaagagtt gtcgcttctg aaatggcaga  | 5220 |
| ggcactcaag ggagtgccaa taaggatatca gacaacagca gtgaagagtg aacacacagg | 5280 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cactttcacc atgcgcctcc tgtctcccgt  | 5340 |
| gagagtcccc 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 gaacaaaaac aaggaagggtg atcagtatat | 5940 |
| ttacatggga cagcctttaa aaaatgatga ggaccacgct cattggacag aagcaaagat  | 6000 |
| gctccttgac aatataaaca caccagaagg gattatccca 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 |
| tcgctggttg gacgccagaa catactctga cccactggct ctgcgcgagt ttaaagagtt  | 6360 |
| tgcagcagga agaagaagcg tctcaggtga cctaataatta gaaataggga aacttccaca | 6420 |
| acatttgacg caaagggcc agaatgcttt ggacaacttg gtcattgttg acaattccga   | 6480 |
| acaaggagga aaagcctata gacatgctat ggaagaactg ccagacacaa tagaaacgtt  | 6540 |
| gatgctccta gccttgatag ctgtgttgac tgggtggagt acgctgttct tcctatcagg  | 6600 |
| aagaggtcta ggaaaaacat ctatcggctt actctgcgtg atggcctcaa gcgcactgtt  | 6660 |
| atggatggcc agtgtggagc cccattggat agcggcctcc atcatactgg agttctttct  | 6720 |
| gatggtactg 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 gtggtttacg atgcaaaatt  | 7320 |

|             |             |            |             |            |              |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|--------------|------|
| tgaaaaacag  | ctaggccaaa  | taatgttggt | gatactttgc  | acatcacaga | ttcttttgat   | 7380 |
| gcggaactaca | tgggccttgt  | gtgaatccat | cacattggct  | actggacctc | tgaccactct   | 7440 |
| ttgggagggg  | tctccaggaa  | aattctggaa | caccacaata  | gcggtatcca | tggcaaakat   | 7500 |
| tttcaggggg  | agttatctag  | caggagcagg | tctggccttc  | tcattaatga | aatctctagg   | 7560 |
| aggaggtagg  | agaggcacgg  | gagcccaagg | ggaaacactg  | ggagaaaaat | ggaaaagaca   | 7620 |
| actaaaccaa  | ctgagcaagt  | cagaattcaa | tactttacaag | aggagtggga | ttatggaggt   | 7680 |
| ggatagatcc  | gaagccaaag  | agggactgaa | aagaggagaa  | acaaccaaac | acgcagtatc   | 7740 |
| gagaggaacg  | gccaaactga  | ggtggttcgt | ggagaggaac  | cttgtgaaac | cagaagggaa   | 7800 |
| agtcatagac  | ctcggttggt  | gaagaggtgg | ctggtcatat  | tattgcgctg | ggctgaagaa   | 7860 |
| agtcacagaa  | gtgaaaggat  | acacaaaagg | aggacctgga  | catgaggaac | caatcccaat   | 7920 |
| ggcgacctat  | ggatggaacc  | tagtaaggct | gcactccgga  | aaagatgtat | tttttatacc   | 7980 |
| acctgagaaa  | tgtgacaccc  | ttttgtgtga | tattggtgag  | tcctctccga | acccaactat   | 8040 |
| agaggaagga  | agaacgttac  | gtgttctgaa | aatggtggaa  | ccatggctca | gaggaaacca   | 8100 |
| attttgcata  | aaaattctaa  | atccctatat | gccgagcgtg  | gtagaaactc | tggaaacaaat  | 8160 |
| gcaaagaaaa  | catggaggaa  | tgctagtgcg | aaaccactc   | tcaagaaatt | ccacccatga   | 8220 |
| aatgtactgg  | gtttcatgtg  | gaacaggaaa | catttgtgtca | gcagtaaaca | tgacatctag   | 8280 |
| aatgttgcta  | 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  | tggtgagatt | gtccaccaa   | ccatgggatg | ttatccccat   | 8580 |
| ggtcacacaa  | atagccatga  | ctgataccac | accctttgga  | caacagaggg | tgtttaaaga   | 8640 |
| gaaagttagc  | acgcgcacac  | caaaagcaaa | acgtggcaca  | gcacaaatta | tggaaagttagc | 8700 |
| agccaggtgg  | ttatgggggt  | tcctttctag | aaacaaaaaa  | cccagaattt | gcacaagaga   | 8760 |
| ggagtttaca  | agaaaagtta  | ggtcaaacgc | agctattgga  | gcagtgttcg | ttgatgaaaa   | 8820 |
| tcaatggaac  | tcggcaaaaag | aagcagtggg | agacgaacgg  | ttctgggaac | ttgtccacag   | 8880 |
| agagagggag  | cttcataaac  | aggggaaatg | tgccacgtgt  | gtctacaata | tgatggggaa   | 8940 |
| gagagagaaa  | aaattaggag  | agttcggaaa | ggcaaaagga  | agtcgtgcaa | tatggtacat   | 9000 |
| gtggttgga   | gcacgcttcc  | tagagtttga | agcccttggt  | ttcatgaatg | aagatcactg   | 9060 |
| gttcagtaga  | gagaattcac  | tcagtggagt | ggaaggagaa  | ggactccaca | aacttgata    | 9120 |
| catactcaga  | gacatatcaa  | ggattccagg | ggggaacatg  | tatgcagatg | acacagccgg   | 9180 |
| atgggacaca  | agaataacag  | aggatgatct | ccagaatgag  | gctaaaatca | ctgacatcat   | 9240 |
| ggagcccga   | catgccctgc  | tggctacgtc | aatctttaag  | ctgacctacc | aaaaataagg   | 9300 |
| ggtaagggtg  | cagagaccag  | caaaaaatgg | aaccgtgatg  | gatgttatat | ccagacgtga   | 9360 |

```

ccagagagggc agtggacagg ttggaactta tggcttaaac actttcacca acatggagggc 9420
ccaactgata agacaaatgg agtctgaggg aatcttttta cccagcgaat tggaaacccc 9480
aaatctagcc ggaagaggtt tcgactgggt ggaaaaatat ggtgtcgaaa ggctgaaaag 9540
aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc 9600
cttaacagct ttgaatgaca tgggaaaagt aagaaaagac ataccacaat gggaaccttc 9660
aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgcc tttctgttca caccacttcc accagctaata 9720
tatgaaggat gggagggaga tagtggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag 9780
ggccagagta tcacaaggcg ccggatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840
atatgcacaa atgtggcagc tgatgtattt ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900
cgctatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960
ccatgccccat caccaatgga tgacaacaga agacatgtta tcagtatgga atagggtctg 10020
gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagtcc 10080
atacctagga aagaggggaag atcagtgggtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140
cacctgggcc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200
gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagt 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 cagaacgcc aaaaatggaa tgggtgtgtt gaatcaacag gttct 10735

```

```

<210> 2
<211> 10735
<212> DNA
<213> Virus da Dengue

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10735)
<223> Virus da Dengue de tipo 1 de caráter 16007 precursor de
        poliprotileño, completo cds

```

```

<400> 2
agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag 60
ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgatc aaccaacgaa aaaagacggg 120
tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt 180
ggcgaagaga ttctcaaaag gattgtcttc aggccaaagg cccatgaaat tgggtgatggc 240

```

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaat                | 300  |
| gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg ggtttcaaga gagaaatctc  | 360  |
| aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct  | 420  |
| gċccacagcc ctggcgttcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag | 480  |
| caagcaggaa agaggaaagt cacttttggt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac  | 540  |
| cctcattgcg atggatttgg gagagtgtg tgaggacacg atgacctaca aatgccccg    | 600  |
| gatcactgag gcggaaccag atgacgttga ctgttggtgc aatgccacgg acacatgggt  | 660  |
| gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt  | 720  |
| ggccccacac gtggggcttg gcctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg  | 780  |
| tgcttgaaa cagatacaa 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 acaaaactag aaggaaagat  | 1320 |
| agttcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca  | 1380 |
| ccaggtggga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc  | 1440 |
| tacgtcggaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca ttagattgtt cacctaggac  | 1500 |
| agggctagat tttaacgaga tgggtgttgc gacaatgaaa gaaagatcat ggcttgtcca  | 1560 |
| caaacaatgg tttctagact taccactgcc ttggacctct ggggcttcaa catcccaaga  | 1620 |
| gacttggaa acagaagatt tactggtcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga   | 1680 |
| agtagtcgta ctaggacac aagaaggagc aatgcacact gcgctgactg gagcgacaga   | 1740 |
| aatccaaacg tcaggaacga caacaatttt cgcaggacac ctaaaatgca gactaaaaat  | 1800 |
| ggacaaacta actttaaaag ggatgtcata tgtgatgtgc acaggctcat tcaagttaga  | 1860 |
| gaaagaagtg gctgagaccc agcatggaac tgttctggtg caggttaaat atgaaggaac  | 1920 |
| agacgcacca tgcaagattc ctttttcgac 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 gccattctgg gagacaccgc atgggacttc ggttctatag gaggagtgtt  | 2220 |
| cacgtctatg ggaaaactgg tacaccaggt ttttggaact gcatatggag ttttgtttag  | 2280 |

|                         |                       |             |                        |                         |            |      |
|-------------------------|-----------------------|-------------|------------------------|-------------------------|------------|------|
| cggagtttct              | tggaccatga            | aaataggaat  | agggattctg             | ctgacatggc              | taggattaaa | 2340 |
| ttcaa <sup>g</sup> gaac | acgtcccttt            | cgatgatgtg  | catcgcagtt             | ggcatggtca              | cactgtacct | 2400 |
| aggagtcag               | gttcaggcag            | attcgggatg  | tgtaatcaac             | tggaaaggca              | gagaacttaa | 2460 |
| atgtggaagc              | ggcatttttg            | tcactaatga  | agttcacact             | tggacagagc              | aatacaaatt | 2520 |
| ccaggctgac              | tcccccaaga            | gactatcagc  | agccattggg             | aaggcatggg              | aggaggggtg | 2580 |
| gtgtggaatc              | cgatcagcca            | ctcgtctcga  | gaacatcatg             | tggaaacaaa              | tatcaaatga | 2640 |
| attgaaccac              | atcctacttg            | aaaatgacat  | gaaatttaca             | gtggtcgtgg              | gagatgttag | 2700 |
| tggaatcttg              | gcccaggga             | aaaaaatgat  | taggccacaa             | cccatggaac              | acaaatactc | 2760 |
| gtggaaaagc              | tggggaaaag            | ccaaaatcat  | aggagcggat             | gtacagaaca              | ccaccttcat | 2820 |
| catcgacggc              | ccaaacaccc            | cagaatgccc  | tgacaatcaa             | agagcatgga              | atatttggga | 2880 |
| agtagaggac              | tatggatttg            | ggattttcac  | gacaaacata             | tggttgaaat              | tgcgtgactc | 2940 |
| ctacacccaa              | gtatgtgacc            | accggctgat  | gtcagctgcc             | attaaggaca              | gcaaggcagt | 3000 |
| ccatgctgac              | atgggggtact           | ggatagaaag  | tga <sup>a</sup> agaac | gagacatgga              | agttggcgag | 3060 |
| agcctccttt              | atagaagtta            | agacatgcat  | ctggccaaaa             | tcccacactc              | tatggagcaa | 3120 |
| tggagtcttg              | gaaagtga <sup>a</sup> | tgataattcc  | aaagatatat             | ggaggaccaa              | tatctcagca | 3180 |
| caactacaga              | ccaggatatt            | tcacacaaac  | agcaggggccg            | tggcacctag              | gcaagttgga | 3240 |
| actagatttc              | gatttttgtg            | aagggtaccac | agttgttgtg             | gatgaacatt              | gtggaaatcg | 3300 |
| aggaccatct              | ctcagaacca            | caacagtcac  | aggaaagata             | atccatgaat              | ggtgctgcag | 3360 |
| atcttgtacg              | ctaccccccc            | tacgtttcaa  | aggggaagac             | gggtgttggg              | acggcatgga | 3420 |
| aatcagacca              | gtgaaggaca            | aggaagagaa  | cctgggtcaag            | 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  | aacgtaccta             | gctttaatgg              | ccactttcaa | 3720 |
| aatgagacca              | atgttcgccg            | tcgggctatt  | atttcgcaga             | cta <sup>a</sup> catcta | gagaagtctt | 3780 |
| tcttcttaca              | attggcttga            | gcctgggtggc | atccgtggag             | ctaccaagtt              | ccctagagga | 3840 |
| gctgggggat              | ggacttgcaa            | taggcatcat  | gatgttgaaa             | ttattgactg              | attttcagtc | 3900 |
| acaccagcta              | tgggctactc            | tgctatcctt  | gacatttatt             | aaa <sup>a</sup> caactt | tttcattgca | 3960 |
| ctatgcatgg              | aagacaatgg            | ctatggtact  | gtcaattgta             | tctctcttcc              | ctttatgcct | 4020 |
| gtccacgacc              | tctcaaaaaa            | caacatggct  | tccgggtgctg            | ttgggatctc              | ttggatgcaa | 4080 |
| accactaccc              | atgtttctta            | taacagaaaa  | caaaatctgg             | ggaaggaaga              | gttggcccct | 4140 |
| caatgaagga              | attatggctg            | ttggaatagt  | tagtattcta             | ctaagttcac              | ttttaaaaaa | 4200 |
| tgatgtgccg              | ctagccggcc            | cattaatagc  | tggaggcatg             | cta <sup>a</sup> tagcat | gttatgtcat | 4260 |
| atccggaagc              | tcagctgatt            | tatcactgga  | gaaagcggct             | gaggtctcct              | gggaggaaga | 4320 |

|            |             |             |            |             |            |            |            |      |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| agcagaacac | tcaggcgcct  | cacacaacat  | actagtagag | gttcaagatg  | atggaaccat | 4380       |            |      |
| gaagataaaa | gatgaagaga  | gagatgacac  | gctcaccatt | ctccttaaag  | caactctgct | 4440       |            |      |
| ggcagtctca | ggggtgtacc  | caatgtcaat  | accagcgacc | ctttttgtgt  | ggtatttttg | 4500       |            |      |
| gcàgaaaaag | aaacagagat  | caggagtgt   | atgggacaca | cccagcccc   | 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  | gaggttggag  | gtttcaagga | tcctggaaca  | cgggagaaga | 4800       |            |      |
| agtacaggtg | attgctgttg  | aaccgggaaa  | aaaccccaaa | aatgtacaaa  | caacgccggg | 4860       |            |      |
| taccttcaag | accctgaag   | gcgaagttgg  | agccatagcc | ttagacttta  | aacctggcac | 4920       |            |      |
| atctggatct | cccatcgtaa  | acagagaggg  | aaaaatagta | ggtctttatg  | gaaatggagt | 4980       |            |      |
| ggtgacaaca | agcggaactt  | acgttagtgc  | catagctcaa | gctaaggcat  | cacaagaagg | 5040       |            |      |
| gcctctacca | gagattgagg  | acgaggtgtt  | taggaaaaga | aacttaacaa  | taatggacct | 5100       |            |      |
| acatccagga | tcgggaaaaa  | caagaagata  | ccttccagcc | atagtccgtg  | aggccataaa | 5160       |            |      |
| aaggaagctg | cgcacgctaa  | 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   | 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 | aaccggtaat | 5820 |
| actaaaagat | ggtccagagc  | gcgtcattct  | agccggaccg | atgccagtga  | ctgtggccag | 5880       |            |      |
| tgccgcccag | aggagaggaa  | gaattggaag  | gaacccaaac | aaggaagggtg | atcagtatat | 5940       |            |      |
| ttacatggga | cagcctttaa  | acaatgatga  | ggaccacgct | cattggacag  | aagcaaagat | 6000       |            |      |
| gctccttgac | aataaaaca   | caccagaagg  | gattatccca | gccctctatg  | 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       |            |      |
| tcgctgggtg | gacgccagaa  | catactctga  | cccactggct | ctgcgcgagt  | ttaaagagtt | 6360       |            |      |

|             |            |            |             |            |             |      |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| tgcagcagga  | agaagaagcg | tctcaggtga | cctaataatta | gaaataggga | aacttccaca  | 6420 |
| acaattgacg  | caaagggccc | agaatgcttt | ggacaacttg  | gtcatgttgc | acaattccga  | 6480 |
| acaaggagga  | aaagcctata | gacatgctat | ggaagaactg  | ccagacacaa | tagaaacgtt  | 6540 |
| gatgctccta  | gccttgatag | ctgtgttgac | tgggtggagt  | acgctgttct | tcctatcagg  | 6600 |
| aagaggtcta  | ggaaaaacat | ctatcggctt | actctgcgtg  | atggcctcaa | gcgcactgtt  | 6660 |
| atggatggcc  | agtgtggagc | cccattggat | agcggcctcc  | atcatactgg | agttctttct  | 6720 |
| gatggtactg  | cttattccag | agccagacag | acagcgact   | ccacaggaca | accagctagc  | 6780 |
| atatgtggtg  | ataggtctgt | tattcatgat | attgacagt   | gcagccaatg | agatgggatt  | 6840 |
| attggaacc   | acaaagaaag | acctggggat | tggccatgta  | gctgctgaaa | accaccacca  | 6900 |
| tgctacaatg  | ctggacgtag | acctacatcc | agcttcagcc  | tggaccctct | atgcagtggc  | 6960 |
| cacaacaatc  | atcactccta | tgatgagaca | cacaattgaa  | aacacaacgg | caaataatttc | 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  | gtggtttacg | atgcaaaatt  | 7320 |
| tgaaaaacaa  | ctaggccaaa | taatgttggt | gatactttgc  | acatcacaga | ttcttttgat  | 7380 |
| gcggactaca  | tgggccttgt | gtgaatccat | cacattggct  | actggacctc | tgaccactct  | 7440 |
| ttgggagggg  | tctccaggaa | aattctggaa | caccacaata  | gcggtatcca | tggcaaacat  | 7500 |
| tttcaggggg  | agttatctag | caggagcagg | tctggccttc  | tcattaatga | aatctctagg  | 7560 |
| aggaggtagg  | agaggcacgg | gagcccaagg | ggaaacactg  | ggagaaaaat | ggaaaagaca  | 7620 |
| actaaaccaa  | ctgagcaagt | cagaattcaa | tacttacaag  | aggagtggga | ttatggaggt  | 7680 |
| ggatagatcc  | gaagccaaag | agggactgaa | aagaggagaa  | acaaccaaac | acgcagtatc  | 7740 |
| gagaggaacg  | gccaaactga | ggtggttcgt | ggagaggaac  | cttgtgaaac | cagaagggaa  | 7800 |
| agtcatagac  | ctcggttgtg | gaagaggtgg | ctggtcatat  | tattgcgctg | ggctgaagaa  | 7860 |
| agtcacagaa  | gtgaaaggat | acacaaaagg | aggacctgga  | catgaggaac | caatcccaat  | 7920 |
| ggcgacctat  | ggatggaacc | tagtaaagct | gcactccgga  | aaagatgtat | ttttataacc  | 7980 |
| acctgagaaa  | tgtgacaccc | ttttgtgtga | tattggtgag  | tcctctccga | accaactat   | 8040 |
| agaggaagga  | agaacgttac | gtgttctgaa | aatggtggaa  | ccatggctca | gaggaaacca  | 8100 |
| atthttgcata | aaaattctaa | atccctatat | gccgagcgtg  | gtagaaactc | tggaacaaat  | 8160 |
| gcaaagaaaa  | catggaggaa | tgctagtgcg | aaaccactc   | tcaagaaatt | ccacccatga  | 8220 |
| aatgtactgg  | gtttcatgtg | gaacaggaaa | cattgtgtca  | gcagtaaaca | tgacatctag  | 8280 |
| aatgttgcta  | 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  | tggtgagatt | gctcaccaaa | ccatgggatg | ttatccccat  | 8580  |
| ggtaacacaa  | atagccatga  | ctgataccac | accctttgga | caacagaggg | tgtttaaaga  | 8640  |
| gaaagttgac  | acgcgcacac  | caaaagcaaa | acgtggcaca | gcacaaatta | tggaagtgc   | 8700  |
| agccaggtgg  | ttatgggggt  | tcctttctag | aaacaaaaaa | cccagaattt | gcacaagaga  | 8760  |
| ggagtttaca  | agaaaagtta  | ggtaaacgc  | agctattgga | gcagtgttcg | ttgatgaaaa  | 8820  |
| tcaatggaac  | tcggcaaaag  | aagcagtgga | agacgaacgg | ttctgggaac | ttgtccacag  | 8880  |
| agagagggag  | cttcataaac  | aggggaaatg | tgccacgtgt | gtctacaata | tgatggggaa  | 8940  |
| gagagagaaa  | aaattaggag  | agttcggaaa | ggcaaaagga | agtcgtgcaa | tatggtacat  | 9000  |
| gtggttggga  | gcacgcttcc  | tagagtttga | agcccttggg | ttcatgaatg | aagatcactg  | 9060  |
| gttcagtaga  | gagaattcac  | tcagtggagt | ggaaggagaa | ggactccaca | aacttggata  | 9120  |
| catactcaga  | gacatatcaa  | ggattccagg | ggggaacatg | tatgcagatg | acacagccgg  | 9180  |
| atgggacaca  | agaataacag  | aggatgatct | ccagaatgag | gctaaaatca | ctgacatcat  | 9240  |
| ggagcccga   | catgccctgc  | tggctacgtc | aatctttaag | ctgacctacc | aaaataaggt  | 9300  |
| ggtaaggggtg | cagagaccag  | caaaaaatgg | aaccgtgatg | gatgttatat | ccagacgtga  | 9360  |
| ccagagaggc  | agtggacagg  | ttggaactta | tggcttaaac | actttcacca | acatggaggc  | 9420  |
| ccaactgata  | agacaaatgg  | agtcggaggg | aatcttttta | cccagcgaat | tggaaacccc  | 9480  |
| aaatctagcc  | ggaagagttc  | tcgactgggt | ggaaaaatat | ggtgtcgaaa | ggctgaaaag  | 9540  |
| aatggcaatc  | agcggagatg  | actgtgtggt | gaaaccaatt | gatgacaggt | tcgcaacagc  | 9600  |
| cttaacagct  | ttgaatgaca  | tgggaaaagt | aagaaaagac | ataccacaat | gggaaccttc  | 9660  |
| aaaaggatgg  | aatgattggc  | aacaagtgcc | tttctgttca | caccacttcc | accagctaata | 9720  |
| tatgaaggat  | gggagggaga  | tagtggtgcc | atgccgcaac | caagatgaac | ttgtggggag  | 9780  |
| ggccagagta  | tcacaaggcg  | ccggatggag | cctgagagaa | accgcatgcc | taggcaagtc  | 9840  |
| atatgcacaa  | atgtggcagc  | tgatgtattt | ccacaggaga | gacctgagac | tggcggctaa  | 9900  |
| cgctatttgt  | tcagccgttc  | cagttgattg | ggtcccaacc | agccgcacca | cctgggtcgat | 9960  |
| ccatgcccac  | caccaatgga  | tgacaacaga | agacatgtta | tcagtatgga | atagggctctg | 10020 |
| gatagaggaa  | aacccatgga  | tggaggataa | gactcatgtg | tccagttggg | aagaagttcc  | 10080 |
| atacctagga  | aagaggggaag | atcagtgggt | tggatccctg | ataggcttaa | cagcaagggc  | 10140 |
| cacctgggcc  | 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  | aatgaagtc   | aggccgaaag | ccacggtttg | agcaagccgt | gctgcctgtg  | 10440 |

```

gctccatcgt ggggatgtaa aaacccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500
ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560
acaccagggg aagctgtacc ctggtggtaa ggactagagg ttagaggaga ccccccgcgt 10620
aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcatc 10680
attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tgggtgctgtt gaatcaacag gttct 10735

```

```

<210> 3
<211> 10735
<212> DNA
<213> Virus da Dengue

```

```

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

```

Virus da Dengue de tipo 1 de caráter (PDK-13) precursor de poliprotileño, completo cds

```

<400> 3
agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag 60
ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgatc aaccaacgaa aaaagacggg 120
tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt 180
ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaagga cccatgaaat tggatgaggc 240
tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggctagatg 300
gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg ggtttcaaga gagaaatctc 360
aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct 420
gcccacagcc ctggcgttcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag 480
caagcaggaa agaggaaagt cacttttggt caagacctct gcagggtgtca acatgtgcac 540
cctcattgcg atggatttgg gagagtgtgt 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
tgcttggaag 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  | gtgccaaagt  | taagtgtgtg  | acaaaactag  | aaggaaagat | 1320 |
| agctcaatat  | gaaaacctaa  | aatattcagt  | gatagtcacc  | gtccacactg  | gagatcagca | 1380 |
| ccagggtggga | aatgagacta  | cagaacatgg  | aacaactgca  | accataacac  | ctcaagctcc | 1440 |
| taegtggga   | atacagctga  | ccgactacgg  | aacccttaca  | ttagattggt  | cacctaggac | 1500 |
| agggctagat  | tttaacgaga  | tggtgttgct  | gacaatgaaa  | aagaaatcat  | ggcttgcca  | 1560 |
| caaacagtgg  | tttctagact  | taccactgcc  | ttggacctct  | ggggctttaa  | catcccaaga | 1620 |
| gacttggaac  | agacaagatt  | tactggtcac  | atttaagaca  | gctcatgcaa  | agaagcagga | 1680 |
| agtagtcgta  | ctaggatcac  | aagaaggagc  | aatgcacact  | gcgctgactg  | gagcgacaga | 1740 |
| aatccaaacg  | tcaggaacga  | caacaatttt  | cgcaggacac  | ctaaaatgca  | gactaaaaat | 1800 |
| ggacaaaacta | actttaaaag  | ggatgtcata  | tgtgatgtgc  | acaggctcat  | tcaagttaga | 1860 |
| gaaagaagtg  | gctgagaccc  | agcatggaac  | tgttctgggtg | caggttaaat  | atgaaggaac | 1920 |
| agacgcacca  | tgcaagattc  | ccttttcgac  | ccaagatgag  | aaaggagcaa  | cccagaatgg | 1980 |
| gagattaata  | acagccaacc  | ccatagtcac  | tgacaaagaa  | aaaccagtca  | atattgaggc | 2040 |
| agaaccaccc  | tttggtgaga  | gctacatcgt  | ggtaggagca  | ggtgaaaaag  | ctttgaaact | 2100 |
| aagctgggtc  | aagaaaaggaa | gcagcatagg  | gaaaatgttt  | gaagcaactg  | cccaggagac | 2160 |
| acgaaggatg  | gccattcttg  | gagacaccgc  | atgggacttc  | ggttctatag  | gaggagtgtt | 2220 |
| cacgtctatg  | ggaaaactgg  | tacaccaggt  | ttttggaact  | gcataatggag | ttttgtttag | 2280 |
| cggagtttct  | tggaccatga  | aaataggaat  | agggattctg  | ctgacatggc  | taggattaaa | 2340 |
| ttcaaggaac  | acgtcccttt  | cggatgatgtg | catcgcagtt  | ggcatggtca  | cactgtacct | 2400 |
| aggagtcatg  | gttcaggcag  | attcgggatg  | tgtaatcaac  | tggaaaggca  | gagaacttaa | 2460 |
| atgtggaagc  | ggcatttttg  | tcactaatga  | 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  | gccaaggga   | aaaaaatgat  | taggccacaa  | cccatggaac  | acaaatactc | 2760 |
| gtggaaaagc  | tggggaaaag  | ctaaaatcat  | aggagcggat  | gtacagaaca  | ccaccttcac | 2820 |
| catcgacggc  | ccaaacaccc  | cagaatgcc   | tgacaatcaa  | agagcatgga  | atatttgga  | 2880 |
| agtagaggac  | tatggatttg  | ggattttcac  | gacaaacata  | tggttgaaat  | tgcgtgactc | 2940 |
| ctacacccaa  | gtatgtgacc  | accggctgat  | gtcagctgcc  | attaaggaca  | gcaaggcagt | 3000 |
| ccatgctgac  | atgggggtact | ggatagaaaag | 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  | gattttttgtg | aagggtaccac | agttgttggtg | gatgaacatt  | gtggaaatcg | 3300 |

|                          |             |                         |            |                          |                          |      |
|--------------------------|-------------|-------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|------|
| aggaccatct               | ctcagaacca  | caacagtcac              | aggaaagata | atccatgaat               | ggtgctgcag               | 3360 |
| atcttg <sup>4</sup> tacg | ctaccccccc  | tacgtttcaa              | aggggaagac | gggtg <sup>4</sup> ttggt | acggcatgga               | 3420 |
| aatcagacca               | gtgaaggaca  | aggaagagaa              | cctggtcaag | tcaatggtct               | ctgcagggtc               | 3480 |
| aggaga <sup>4</sup> agtg | gacagctttt  | cactaggact              | gctatgcata | tcaataatga               | ttgaagaagt               | 3540 |
| gatgagatcc               | agatggagca  | aaaaaatgct              | gatgactgga | acactggctg               | tg <sup>4</sup> ttcctcct | 3600 |
| tcttataatg               | ggacaattga  | catggagtga              | tctgatcagg | ttatgtatta               | tggttg <sup>4</sup> gagc | 3660 |
| caacgcttca               | gacaagatgg  | ggatgggaac              | aacgtacct  | gctttaatgg               | ccactttcaa               | 3720 |
| aatgagacca               | atgttcgccg  | tcgggctatt              | atttcgcaga | ctaacatcta               | gagaagttct               | 3780 |
| tcttcttaca               | attggcttga  | gcctgg <sup>4</sup> ggc | atccgtggag | ctaccaagtt               | ccctagagga               | 3840 |
| gctgggggat               | ggacttgcaa  | taggcatcat              | gatgttgaaa | ttattgactg               | at <sup>4</sup> ttcagtc  | 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              | caaatctgg  | ggaaggaaga               | gttggccctt               | 4140 |
| caatgaagga               | attatggctg  | ttggaatagt              | tagtattcta | ctaagttcac               | ttttaaaaaa               | 4200 |
| tgatgtgccg               | ctagccggcc  | cattaatagc              | tggaggcatg | ctaatagcat               | gttatgtcat               | 4260 |
| atccggaagc               | tcagctgatt  | tatcactgga              | gaaagcggct | gaggtctcct               | gggaggaaga               | 4320 |
| agcagaacac               | tcaggcgcct  | cacacaacat              | actagtagag | gttcaagatg               | atggaaccat               | 4380 |
| gaagataaaa               | gatgaagaga  | gagatgacac              | gctcaccatt | ctccttaaag               | caactctgct               | 4440 |
| ggcagtctca               | ggggtgtacc  | caatgtcaat              | accagcgacc | ctttttgtgt               | ggtat <sup>4</sup> tttg  | 4500 |
| gcagaaaaag               | aaacagagat  | caggagtgct              | atgggacaca | cccagcccc                | cagaagtgga               | 4560 |
| aagagcagtt               | cttgatgatg  | gcatctatag              | aattttgcaa | agaggactgt               | tgggcaggtc               | 4620 |
| ccaagtagga               | gtaggagttt  | tccaagaagg              | cgtgttcac  | acaatgtggc               | acgtcactag               | 4680 |
| gggagctgtc               | ctcatgtatc  | aaggaaaaag              | gctggaacca | agctgggcca               | gtgtcaaaaa               | 4740 |
| agacttgatc               | tcatatggag  | gaggttggag              | gtttcaagga | tcctggaaca               | cgggagaaga               | 4800 |
| agtacaggtg               | attgctgttg  | aaccgggaaa              | aaaccccaaa | aatgtacaaa               | caacgccggg               | 4860 |
| taccttcaag               | acccctgaag  | gcgaagt <sup>4</sup> tg | agccatagcc | ttagacttta               | aacctggcac               | 4920 |
| atctggatct               | cccatcgtaa  | acagagaggg              | aaaaatagta | ggtctttatg               | gaaatggagt               | 4980 |
| ggtgacaaca               | agcggaaactt | acgttagtgc              | catagctcaa | gctaaggcat               | cacaagaagg               | 5040 |
| gcctctacca               | gagattgagg  | acaaggtgtt              | taggaaaaga | aacttaacaa               | taatggacct               | 5100 |
| acatccagga               | tcgggaaaaa  | caagaagata              | ccttcagcc  | atagtccgtg               | aggccataaa               | 5160 |
| aaggaagctg               | cgcacgctaa  | tcctagctcc              | cacaagagtt | gtcgcttctg               | aaatggcaga               | 5220 |
| ggcactcaag               | ggagtgccaa  | taaggtatca              | 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   | 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 |
| gggagcaaat | ttccggggccg | acagggtaat  | agacccaagg  | cgggtgtctga | aaccggtaat  | 5820 |
| actaaaagat | ggtccagagc  | gcgtcattct  | agccggaccg  | atgccagtga  | ctgtggccag  | 5880 |
| tgccgcccag | aggagaggaa  | gaattggaag  | gaacccaaaac | aaggaagggtg | atcagtatat  | 5940 |
| ttacatggga | cagcctttaa  | acaatgatga  | ggaccacgct  | cattggacag  | aagcaaagat  | 6000 |
| gctccttgac | aatataaaca  | caccagaagg  | gattatccca  | gccctctttg  | agccggagag  | 6060 |
| agaaaagagt | gcagctatag  | acggggaata  | cagactgcgg  | ggtgaagcaa  | ggaaaacgtt  | 6120 |
| cgtggagctc | atgagaagag  | gggatctacc  | agtctggcta  | tcctacaaag  | ttgcctcaga  | 6180 |
| aggcttccag | tactccgaca  | gaagggtggtg | cttcgatggg  | gaaaggaaca  | accagggtgtt | 6240 |
| ggaggagaac | atggacgtgg  | agatctggac  | aaaagaagga  | gaaagaaaga  | aactacgacc  | 6300 |
| tcgctggttg | gacgccagaa  | catactctga  | cccactggct  | ctgcgcgagt  | ttaaagagtt  | 6360 |
| tgcagcagga | agaagaagcg  | tctcagggtga | cctaataatta | gaaataggga  | aacttccaca  | 6420 |
| acatttgacg | caaagggccc  | agaatgcttt  | ggacaacttg  | gtcatgttgc  | acaattccga  | 6480 |
| acaaggagga | aaagcctata  | gacatgctat  | ggaagaactg  | ccagacacaa  | tagaaacgtt  | 6540 |
| gatgtccta  | gccttgatag  | ctgtgttgac  | tggtggagtg  | acgctgttct  | tcctatcagg  | 6600 |
| aagaggtcta | ggaaaaacat  | ctatcggctt  | actctgcgtg  | atggcctcaa  | gcgcactgtt  | 6660 |
| atggatggcc | agtgtggagc  | cccattggat  | agcggcctcc  | atcatactgg  | agttctttct  | 6720 |
| gatggtactg | cttattccag  | agccagacag  | acagcgcact  | ccacaggaca  | accagctagc  | 6780 |
| atatgtggtg | ataggtctgt  | tattcgtgat  | attgacagtg  | gcagccaatg  | agatgggatt  | 6840 |
| attggaaacc | acaagaaag   | acctggggat  | tggccatgta  | gctgctgaaa  | accaccacca  | 6900 |
| tgctacaatg | ctggacgtag  | acctacatcc  | agcttcagcc  | tggaccctct  | atgcagtggc  | 6960 |
| cacaacaatc | atcactccta  | tgatgagaca  | cacaattgaa  | aacacaacgg  | caaatatctt  | 7020 |
| cctgacagcc | atcgcaaacc  | aagcagctat  | attgatggga  | cttgacaagg  | gatggccaat  | 7080 |
| atcgaagatg | gacataggag  | ttccacttct  | cgcttgggg   | tgctattccc  | aagtgaatcc  | 7140 |
| gctgacactg | atagcggcag  | tattgatgct  | agtagctcat  | tacgccataa  | ttggacctgg  | 7200 |
| actgcaagca | aaagctacta  | gagaagctca  | aaaaagaaca  | gcggctggaa  | taatgaaaaa  | 7260 |
| tccaactgtc | gacgggattg  | ttgcaataga  | cttagatccc  | gtgggtttacg | atgcaaaatt  | 7320 |
| tgaaaaacag | ctaggccaaa  | taatgttggt  | gatactttgc  | acatcacaga  | ttcttttgat  | 7380 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gcggactaca tgggccttgt gtgaatccat cacattggct actggacctc tgaccactct  | 7440 |
| ttgggaggga tctccaggaa aattcttgaa caccacaata gcggtatcca tggcaaacat  | 7500 |
| tttcaggggg agttatctag caggagcagg tctggccttc tcattaatga aatctctagg  | 7560 |
| aggaggtagg agaggcacgg gagcccaagg ggaaacactg ggagaaaaat ggaaaagaca  | 7620 |
| actaaaccaa ctgagcaagt cagaattcaa tacttacaag aggagtggga ttatggagggt | 7680 |
| ggatagatcc gaagccaaag agggactgaa aagaggagaa acaaccaaac acgcagtatc  | 7740 |
| gagaggaacg gccaaactga ggtggttcgt ggagaggaac cttgtgaaac cagaagggaa  | 7800 |
| agtcatagac ctcggttggt gaagagggtg ctggtcatat tattgcgctg 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 gaggaacca   | 8100 |
| attttgcata aaaattctaa atccctatat gccgagcgtg gtagaaactc tggacaaat   | 8160 |
| gcaaagaaaa catggaggaa tgctagtgcg aaaccactc tcaagaaatt ccacccatga   | 8220 |
| aatgtactgg gtttcatgtg gaacaggaaa catttgttca gcagtaaaca tgacatctag  | 8280 |
| aatgttgcta 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 tggtgagatt gctcaccaaa ccatgggatg ttatccccat  | 8580 |
| ggtcacacaa atagccatga ctgataccac accctttgga caacagaggg tgtttaaaga  | 8640 |
| gaaagttgac acgcgcacac caaaagcaaa acgtggcaca gcacaaatta tggagtgac   | 8700 |
| agccaggtgg ttatgggggt tcctttctag aaacaaaaaa cccagaattt gcacaagaga  | 8760 |
| ggagtttaca agaaaagtta ggtcaaacgc agctattgga gcagtgttcg ttgatgaaaa  | 8820 |
| tcaatggaac tcggcaaaag aagcagtgga agacgaacgg ttctgggaac ttgtccacag  | 8880 |
| agagaggagg cttcataaac aggggaaatg tgccacgtgt gtctacaata tgatggggaa  | 8940 |
| gagagagaaa aaattaggag agttcggaag ggcaaaagga agtcgtgcaa tatggtacat  | 9000 |
| gtggttgagg gcacgcttcc tagagtgtga agcccttggg ttcattgaatg aagatcactg | 9060 |
| gttcagtaga gagaattcac tcagtggagt ggaaggagaa ggactccaca aacttggata  | 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  
 aaatcttagcc ggaagagttc tcgactgggtt ggaaaaatat ggtgtcgaaa ggctgaaaag 9540  
 aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc 9600  
 cttaacagct ttgaatgaca tgggaaaagt aagaaaagac ataccacaat gggaaccttc 9660  
 aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgcc tttctgttca caccacttcc accagctaatt 9720  
 tatgaaggat gggagggaga tagtgggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag 9780  
 ggccagagta tcacaaggcg ccggatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840  
 atatgcacaa atgtggcagc tgatgtatatt ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900  
 cgctatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960  
 ccatgcccat caccaatgga tgacaacaga agacatgta tcagtatgga atagggtctg 10020  
 gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagttcc 10080  
 atacctagga aagaggggaag atcagtgggtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140  
 cacctgggcc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200  
 gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagt 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 tcccaagaca 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> 4  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 4  
 gttttccag tcacgactac gtggaccgac aagaacag 38

<210> 5  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 5  
 aacagctatg accatgggat ggagttacca gcatcag 37

<210> 6  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 6  
 gttttcccag tcacgactga acaccgacga gacaaac 37

<210> 7  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 7  
 aacagctatg accatgaggt ccaaggcagt ggtaag 36

<210> 8  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 8  
 gttttcccag tcacgacttg gaaatgagac cacagaac 38

<210> 9  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 9  
 aacagctatg accatggaaa caccgctgaa caaaac 36

<210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 10  
 gttttcccag tcacgacggt tcaagaaggg aagcag 36

<210> 11  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 11  
 aaçagctatg accatgttct atccagtacc ccatgtc 37

<210> 12  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 12  
 gttttccag tcacgaccag aataccacct tcatcatcg 39

<210> 13  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 13  
 aacagctatg accatgttcc catccccatc ttgtc 35

<210> 14  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 14  
 gttttccag tcacgacgga aatcagacca gtcaaggag 39

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 15  
 aacagctatg accatgtgtt gtgtgaggca ccagag 36

<210> 16  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 16  
 gttttccag tcacgacgca aaccactaac catgtttc 38

<210> 17  
 <211> 35  
 <212> DNA

<213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 17  
 aacagttatg accatgccac ttgttgtcac cactc 35

<210> 18  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 18  
 gttttcccag tcacgacca agggaagaga ctggaac 37

<210> 19  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 19  
 aacagctatg accatgtcct gatttgatgc ttggaac 37

<210> 20  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 20  
 gttttcccag tcacgacaag cacattttac cgatccag 38

<210> 21  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 21  
 aacagctatg accatggctg tagtttcttt ctttctcctt c 41

<210> 22  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 22  
 gttttcccag tcacgacgca atagacggg aatacag 37

<210> 23  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 23  
 aacagctatg accatgatga tgggtggtttt cagcag 36

<210> 24  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 24  
 gttttccag tcacgacgtg ttgcttattc cagagcc 37

<210> 25  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 25  
 aacagctatg accatggctg tcttttccat ttttctcc 38

<210> 26  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 26  
 gttttccag tcacgacact ttgcacatca cagatcc 37

<210> 27  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 27  
 aacagctatg accatgttcg cactagcatt cctcc 35

<210> 28  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer

<400> 28  
 gttttccag tcacgaccac ctgagaaatg tgacacc 37

<210> 29  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 29  
 aacagctatg accatgtttc cttgtttatg aagctccc 38

<210> 30  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 30  
 gttttccag tcacgaccaa aagcgaaacg aggcac 36

<210> 31  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 31  
 aacagctatg accatggttt caccacacag tcatctcc 38

<210> 32  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 32  
 gttttccag tcacgacaga ccagcgaaaa atggaac 37

<210> 33  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 33  
 aacagctatg accatgtccc aatgagcctt ctcac 35

<210> 34  
 <211> 38  
 <212> DNA

<213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 34  
 gttttccag tcacgacgt aatgctatct gttcagcc 38  
 <210> 35  
 <211> 36  
 <212> Sequência Artificial  
 <213>  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 35  
 aacagctatg accatgtgat tcaacagcac cattcc 36  
 <210> 36  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 36  
 ccatggaagc tgtacgc 17  
 <210> 37  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 37  
 gagacagcag gatctctgg 19  
 <210> 38  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer tail  
 <400> 38  
 gttttccag tcacgac 17  
 <210> 39  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> primer tail  
 <400> 39  
 aacagctatg accatg 16

<210> 40  
 <211> 10723  
 <212> DNA  
 <213> Vírus da Dengue

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(10723)  
 <223> VDV2

<400> 40  
 agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gtcfaatgta 60  
 gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120  
 aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgaacag 180  
 ctgacaaaga gattctcact tggatgctg caggagcag gaccattaaa actgttcattg 240  
 gccctggtgg cgttccttcg tttcctaaca atcccaccaa cagcagggat attgaagaga 300  
 tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gagggttcag gaaagagatt 360  
 ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg 420  
 attccaacag tgatggcggt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgtc 480  
 agcagacaag agaaagggaa aagtcttctg tttaaaacag aggttggcgt gaacatgtgt 540  
 accctcatgg ccatggacct tggatgaattg tgtgaagaca caatcacgta caagtgtccc 600  
 cttctcaggc agaatgagcc agaagacata gactgttggg gcaactctac gtccacgtgg 660  
 gtaacttatg ggacgtgtac caccatggga gaacatagaa gagaaaaaag atcagtggca 720  
 ctggttcac atgtgcgaat gggactggag acacgaactg aaacatggat gtcacagaa 780  
 ggggcctgga aacatgtcca gagaattgaa acttggatct tgagacatcc aggcctcacc 840  
 atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttccaaag agccctgatt 900  
 ttcattctac tgacagctgt cactccttca atgacaatgc gttgcatagg aatgtcaaat 960  
 agagactttg tggaaggggt ttcaggagga agctgggttg acatagtctt agaacatgga 1020  
 agctgtgtga cgacgatggc aaaaaacaaa ccaacattgg attttgaact gataaaaaca 1080  
 gaagccaaac agcctgccac cctaaggaag tactgtatag aggcaaagct aaccaacaca 1140  
 acaacagaat ctgctgccc aacacaaggg gaaccagcc taaatgaaga gcaggacaaa 1200  
 aggttcgtct gcaaacactc catggtagac agaggatggg gaaatggatg tggactatct 1260  
 ggaaggggag gcattgtgac ctgtgctatg ttcagatgca aaaagaacat ggaaggaaaa 1320  
 gttgtgcaac cagaaaactt ggaatacacc attgtgataa cacctcactc aggggaagag 1380  
 catgcagtcg gaaatgacac aggaacacat ggcaaggaaa tcaaaataac accacagagt 1440  
 tccatcacag aagcagaatt gacagggtat ggcactgtca caatggagtg ctctccaaga 1500  
 acgggcctcg acttcaatga gatgggtgtg ctgcagatgg aaaataaagc ttggctggtg 1560  
 cacaggcaat gggtcctaga cctgccgtta ccatggttgc ccggagcgga cacacaagag 1620  
 tcaaattgga tacagaagga gacattggtc actttcaaaa atcccatgc gaagaaacag 1680

|                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| gatgttgttg ttttaggatc ccaagaagg gccatgcaca cagcacttac agggggccaca    | 1740 |
| gaaafccaaa tgtcatcagg aaacttactc ttcacaggac atctcaagtg caggctgaga    | 1800 |
| atggacaagc tacagctcaa aggaatgtca tactctatgt gcacaggaaa gtttaaagtt    | 1860 |
| gtgaaggaaa tagcagaaac acaacatgga acaatagtta tcagagtgcata atatgaaggg  | 1920 |
| gacggctctc catgcaagat cccttttgag ataatggatt tggaaaaaag acatgtctta    | 1980 |
| ggtcgcctga ttacagtcaa cccaattgtg 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 |
| tttacctcta taggaaaggc tctccaccaa gtctttggag caatctatgg agctgccttc    | 2280 |
| agtgggggtt catggactat gaaaatcctc ataggagtca ttatcacatg gataggaatg    | 2340 |
| aattcacgca gcacctcact gtctgtgaca ctagtattgg tgggaattgt gacactgtat    | 2400 |
| ttgggagtcata tgggtgcaggc cgatagtggg tgcgttgtga gctggaaaaa caaagaactg | 2460 |
| aaatgtggca gtgggatttt catcacagac aacgtgcaca catggacaga acaatacaaa    | 2520 |
| ttccaaccag aatccccctc aaaactagct tcagctatcc agaaagccca tgaagaggac    | 2580 |
| atgtgtggaa tccgctcagt aacaagactg gagaatctga tgtggaaaca aataacacca    | 2640 |
| gaattgaatc acattctatc agaaaatgag gtgaagttaa ctattatgac aggagacatc    | 2700 |
| aaaggaatca tgcaggcagg aaaacgatct ctgcggcctc agcccactga gctgaagtat    | 2760 |
| tcattggaaaa catggggcaa agcaaaaatg ctctctacag agtctcataa ccagacctt    | 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 agtgactca atgacacatg gaagatagag     | 3060 |
| aaagcctctt tcattgaagt taaaaactgc cactggccaa aatcacacac cctctggagc    | 3120 |
| aatggagtgc tagaaagtga gatgataatt ccaaagaatc tcgctggacc agtgtctcaa    | 3180 |
| cacaactata gaccaggcta ccatacacia ataacaggac catggcatct aggttaagctt   | 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 actccttggc cacagctgga    | 3480 |
| catgggcagg tcgacaactt ttcactagga gtcttgggaa tggcattgtt cctggaggaa    | 3540 |
| atgcttagga cccgagtagg aacgaaacat gcaatactac tagttgcagt ttcttttgtg    | 3600 |
| acattgatca cagggaacat gtcctttaga gacctgggaa gagtgatggg tatggtaggc    | 3660 |
| gccactatga cggatgacat aggtatgggc gtgacttatc ttgccctact agcagccttc    | 3720 |

|            |             |             |             |            |            |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| aaagtcagac | caacttttgc  | agctggacta  | ctcttgagaa  | agctgacctc | caaggaattg | 3780 |
| atgatgacta | ctataggaat  | tgtactcctc  | tcccagagca  | ccataccaga | gaccattctt | 3840 |
| gagttgactg | atgCGttagc  | cttaggcatg  | atggtcctca  | aaatggtgag | aaatatggaa | 3900 |
| aagtatcaat | tggcagtgc   | tatcatggct  | atcttgTgcg  | tcccaaacgc | agtgatatta | 3960 |
| caaaacgcat | ggaaagtgag  | ttgcacaata  | ttggcagtgg  | tgtccgtttc | cccactgttc | 4020 |
| ttaacatcct | 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  | 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  | ttacaaagaa  | ggaacattcc  | atacaatgtg | gcatgtcaca | 4680 |
| cgtggcgctg | ttctaattgca | taaaggaaaag | aggattgaac  | caacatgggc | 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 |
| gttgttacia | ggagtggagc  | atatgtgagt  | gctatagccc  | agactgaaaa | aagcattgaa | 5040 |
| gacaaccag  | agatcgaaga  | tcacattttc  | cgaaagagaa  | gactgaccat | catggacctc | 5100 |
| caccaggag  | cgggaaagac  | gaagagatac  | cttccggcca  | tagtcagaga | agctataaaa | 5160 |
| cggggtttga | gaacattaat  | cttggcccc   | actagagttg  | tggcagctga | aatggaggaa | 5220 |
| gcccttagag | gacttccaat  | aagataccag  | acccagcca   | tcagagctga | gcacaccggg | 5280 |
| cgggagattg | tggacctaata | 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  | tgggaattccg | gacatgaatg | ggtcacggat | 5580 |
| tttaaaggga | agactgtttg  | gttcgttcca  | agtataaaaag | caggaaatga | tatagcagct | 5640 |
| tgcctgagga | aaaatggaaa  | gaaagtgata  | caactcagta  | ggaagacctt | tgattctgag | 5700 |
| tatgtcaaga | ctagaaccaa  | tgattgggac  | ttcgtgggtta | caactgacat | ttcagaaatg | 5760 |

ggtgccaatt tcaaggctga gaggggttata gacccagac gctgcatgaa accagtcata 5820  
 ctaacagatg gtgaagagcg ggtgattctg gcaggaccta tgccagtgaac ccactctagt 5880  
 gcagcacaaa gaagagggag aataggaaga aatccaaaaa atgagaatga ccagtacata 5940  
 tãcatggggg aacctctgga aaatgatgaa gactgtgcac actggaaaga agctaaaatg 6000  
 ctcttagata acatcaacac gccagaagga atcattccta gcatgttcga accagagcgt 6060  
 gaaaagggtg atgccattga tggcgaatac cgcttgagag gagaagcaag gaaaaccttt 6120  
 gtagacttaa tgagaagagg agacctacca gtctggttgg cctacagagt ggcagctgaa 6180  
 ggcatcaact acgcagacag aagggtggtgt tttgatggag tcaagaacaa ccaaactccta 6240  
 gaagaaaacg tggaagtga aatctggaca aaagaagggg aaaggaagaa attgaaaccc 6300  
 agatggttgg atgctaggat ctattctgac ccactggcgc taaaagaatt taaggaattt 6360  
 gcagccggaa gaaagtctct gacctgaac ctaatcacag aaatgggtag gctcccaacc 6420  
 ttcagtactc agaaggcaag agacgcactg gacaacttag cagtgtgca cacggctgag 6480  
 gcagggtgaa gggcgtacaa ccatgtctc agtgaactgc cggagaccct ggagacattg 6540  
 cttttactga cacttctggc tacagtcacg ggagggatct ttttattctt gatgagcgca 6600  
 aggggcatag ggaagatgac cctgggaatg tgctgcataa tcacggctag catcctccta 6660  
 tgggtacgcac aaatacagcc aactggata gcagcttcaa taatactgga gttttttctc 6720  
 atagttttgc ttattccaga acctgaaaaa cagagaacac cccaagacaa ccaactgacc 6780  
 tacgttgtca 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 ctttctcgcc attggatgct actcacaagt caaccccata 7140  
 actctcacag cagctctttt cttattggta gcacattatg ccatcatagg gccaggactc 7200  
 caagcaaaag caaccagaga agctcagaaa agagcagcgg cgggcatcat gaaaaacca 7260  
 actgtcgtatg gaataacagt gattgacctg 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 acgcttgag 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 catcccgcc 7980  
 gaaaagtgtg acacattatt gtgtgacata ggggagtcac caccaaattcc cacagtggaa 8040  
 gcaggacgaa cactcagagt ccttaactta gtagaaaatt ggttgaacaa caaactcaa 8100  
 ttttgcataa aggttctcaa cccatatatg ccctcagtc tagaaaaaat ggaagcacta 8160  
 caaaggaaat atggaggagc cttagttagg aatccactct cacgaaactc cacacatgag 8220  
 atgtactggg tatccaatgc ttccgggaac atagtgtcat cagtgaacat gatttcaagg 8280  
 atgttgatca acagatttac aatgagatac aagaaagcca cttacgagcc ggatgttgac 8340  
 ctcggaagcg gaacccgtaa catcgggatt gaaagtgaga taccaaacct agatataatt 8400  
 gggaaaagaa tagaaaaaat aaagcaagag catgaaacat catggcacta tgaccaagac 8460  
 caccataca aaacgtgggc ataccatggg agctatgaaa caaacagac tggatcagca 8520  
 tcatccatgg tcaacggagt ggtcaggctg ctgacaaaac cttgggacgt tgtcccatg 8580  
 gtgacacaga tggcaatgac agacacgact ccatttggac aacagcgcgt ttttaaagag 8640  
 aaagtggaca cgagaacca agaaccgaaa gaaggcacga agaaactaat gaaaataaca 8700  
 gcagagtggc tttggaaaga attagggag aaaaagacac ccaggatgtg caccagagaa 8760  
 gaattcaca 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 tcttaaatga agatcactgg 9060  
 ttctccagag agaactccct gagtggagtg gaaggagaag ggctgcacaa gctagggttac 9120  
 attctaagag acgtgagcaa gaaagaggga ggagcaatgt atgccgatga caccgcagga 9180  
 tgggatacaa aaatcacact agaagaccta aaaaatgaag agatggtaac aaaccacatg 9240  
 gaaggagaac acaagaaact agccgaggcc attttcaaac taacgtacca aaacaagggtg 9300  
 gtgcgtgtgc aaagaccaac accaagaggc acagtaatgg acatcataatc 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 ttgtgttggt aaaccttag atgacagggt cgcaagcgct 9600  
 ttaacagctc taaatgacat gggaaagatt aggaaagaca tacaacaatg ggaaccttca 9660  
 agaggatgga atgattggac acaagtggc ttctgttcac accatttcca tgagttaatc 9720  
 atgaaagacg gtcgcgtact cgttgttcca ttagaaaacc aagatgaact gattggcaga 9780  
 gcccgaatct cccaaggagc aggtgtgtct ttgcgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840

```

tacgccccaa tgtggagctt gatgtacttc cacagacgcg acctcaggct ggcgggcaa 9900
gctattttgct cggcagtacc atcacattgg gttccaacaa gtcgaacaac ctggtccata 9960
catgctaaac atgaatggat gacaacggaa gacatgctga cagtctggaa caggggtgtg 10020
attcaagaaa acccatggat ggaagacaaa actccagtgg aaacatggga ggaaatccca 10080
tacttgggga aaagagaaga ccaatggtgc ggctcattga ttgggttaac aagcagggcc 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 naggacgtta aaagaagtca 10380
ggccatcata aatgccatag cttgagtaaa ctatgcagcc thtagctcca cctgagaagg 10440
tgtaaaaaat ccggggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc 10500
ggttagggga gaccctccc ttacaaatcg cagcaacaat gggggcccaa ggcgagatga 10560
agctgtagtc tcgctggaag gactagaggt tagaggagac ccccccgaac caaaaaacag 10620
catattgacg ctgggaaaga ccagagatcc tgctgtctcc tcagcatcat tccaggcaca 10680
gaacgccaga aatggaatg gtgctgttga atcaacaggt tct 10723

```

```

<210> 41
<211> 3392
<212> PRT
<213> Vírus da Dengue

```

```

<220> Cadeia
<221>
<222> (1)..(114)
<223> Proteína Cápside

```

```

<220> Cadeia
<221>
<222> (115)..(280)
<223> Premembrana protéico

```

```

<220> Cadeia
<221>
<222> (281)..(775)
<223> Glicoproteína do envelope

```

```

<220> Cadeia
<221>
<222> (776)..(1127)
<223> Proteína 1 não estrutural

```

```

<220> Cadeia
<221>
<222> (1128)..(1345)
<223> Proteína 2A não estrutural

```

```

<220> Cadeia
<221>
<222> (1346)..(1475)
<223> Proteína 2B não estrutural

```

```

<220>
<221> Cadeia
<222> (1476)..(2094)
<223> Proteína 3 não estrutural

<220> Cadeia
<221>
<222> (2095)..(2244)
<223> Proteína 4A não estrutural

<220> Cadeia
<221>
<222> (2245)..(2493)
<223> Proteína 4B não estrutural

<220> Cadeia
<221>
<222> (2494)..(3392)
<223> Proteína 5 não estrutural

<400> 41

Met Ile Asn Gln Arg Lys Lys Thr Gly Arg Pro Ser Phe Asn Met Leu
1          5          10          15

Lys Arg Ala Arg Asn Arg Val Ser Thr Val Ser Gln Leu Ala Lys Arg
          20          25          30

Phe Ser Lys Gly Leu Leu Ser Gly Gln Gly Pro Met Lys Leu Val Met
          35          40          45

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

Ile Leu Ala Arg Trp Gly Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Ile Lys Val
65          70          75          80

Leu Arg Gly Phe Lys Arg Glu Ile Ser Asn Met Leu Asn Ile Met Asn
          85          90          95

Arg Arg Lys Arg Ser Val Thr Met Leu Leu Met Leu Leu Pro Thr Ala
          100          105          110

Leu Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Gly Gly Glu Pro His Met Ile Val
          115          120          125

Ser Lys Gln Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ser Ala Gly
          130          135          140

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

Asp Thr Met Thr Tyr Lys Cys Pro Arg Ile Thr Glu Ala Glu Pro Asp
          165          170          175

Asp Val Asp Cys Trp Cys Asn Ala Thr Asp Thr Trp Val Thr Tyr Gly
          180          185          190

```

Thr Cys Ser Gln Thr Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala  
 195 200 205  
 Leu Ala Pro His Val Gly Leu Gly Leu Glu Thr Arg Ala Glu Thr Trp  
 210 215 220  
 Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys Gln Ile Gln Lys Val Glu Thr Trp  
 225 230 235 240  
 Ala Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Val Ile Ala Leu Phe Leu Ala His  
 245 250 255  
 Ala Ile Gly Thr Ser Ile Thr Gln Lys Gly Ile Ile Phe Ile Leu Leu  
 260 265 270  
 Met Leu Val Thr Pro Ser Met Ala Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn  
 275 280 285  
 Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val 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 Ile Glu Leu Leu Lys Thr Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu  
 325 330 335  
 Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser  
 340 345 350  
 Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala  
 355 360 365  
 Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly  
 370 375 380  
 Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys  
 385 390 395 400  
 Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys Ile Ala Gln Tyr Glu Asn Leu Lys  
 405 410 415  
 Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly  
 420 425 430  
 Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala  
 435 440 445  
 Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr Asp Tyr Gly Thr Leu Thr Leu Asp  
 450 455 460

Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr  
 465 470 475 480  
 Met Lys Lys Lys Ser Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu  
 485 490 495  
 Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn  
 500 505 510  
 Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln  
 515 520 525  
 Glu 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 Thr Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala  
 545 550 555 560  
 Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly  
 565 570 575  
 Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val  
 580 585 590  
 Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly  
 595 600 605  
 Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly  
 610 615 620  
 Ala Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp  
 625 630 635 640  
 Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser  
 645 650 655  
 Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe  
 660 665 670  
 Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly  
 675 680 685  
 Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser  
 690 695 700  
 Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Met Gly Lys Leu Val His Gln Val Phe  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys  
 725 730 735

Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Asn  
 740 745 750  
 Thr Ser Leu Ser Val Met Cys Ile Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr  
 755 760 765  
 Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys Val Ile Asn Trp Lys  
 770 775 780  
 Gly Arg Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Asn Glu Val  
 785 790 795 800  
 His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Ala Asp Ser Pro Lys Arg  
 805 810 815  
 Leu Ser Ala Ala Ile Gly Lys Ala Trp Glu Glu Gly Val Cys Gly Ile  
 820 825 830  
 Arg Ser Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Met Trp Lys Gln Ile Ser Asn  
 835 840 845  
 Glu Leu Asn His Ile Leu Leu Glu Asn Asp Met Lys Phe Thr Val Val  
 850 855 860  
 Val Gly Asp Val Ser Gly Ile Leu Ala Gln Gly Lys Lys Met Ile Arg  
 865 870 875 880  
 Pro Gln Pro Met Glu His Lys Tyr Ser Trp Lys Ser Trp Gly Lys Ala  
 885 890 895  
 Lys Ile Ile Gly Ala Asp Val Gln Asn Thr Thr Phe Ile Ile Asp Gly  
 900 905 910  
 Pro Asn Thr Pro Glu Cys Pro Asp Asn Gln Arg Ala Trp Asn Ile Trp  
 915 920 925  
 Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Ile Phe Thr Thr Asn Ile Trp Leu  
 930 935 940  
 Lys Leu Arg Asp Ser Tyr Thr Gln Val Cys Asp His Arg Leu Met Ser  
 945 950 955 960  
 Ala Ala Ile Lys Asp Ser Lys Ala Val His Ala Asp Met Gly Tyr Trp  
 965 970 975  
 Ile Glu Ser Glu Lys Asn Glu Thr Trp Lys Leu Ala Arg Ala Ser Phe  
 980 985 990  
 Ile Glu Val Lys Thr Cys Ile Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Ser  
 995 1000 1005

|     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Asn | Gly  | Val | Leu | Glu | Ser | Glu  | Met | Ile | Ile | Pro | Lys  | Ile | Tyr | Gly |
|     | 1010 |     |     |     |     | 1015 |     |     |     |     | 1020 |     |     |     |
| Gly | Pro  | Ile | Ser | Gln | His | Asn  | Tyr | Arg | Pro | Gly | Tyr  | Phe | Thr | Gln |
|     | 1025 |     |     |     |     | 1030 |     |     |     |     | 1035 |     |     |     |
| Thr | Ala  | Gly | Pro | Trp | His | Leu  | Gly | Lys | Leu | Glu | Leu  | Asp | Phe | Asp |
|     | 1040 |     |     |     |     | 1045 |     |     |     |     | 1050 |     |     |     |
| Phe | Cys  | Glu | Gly | Thr | Thr | Val  | Val | Val | Asp | Glu | His  | Cys | Gly | Asn |
|     | 1055 |     |     |     |     | 1060 |     |     |     |     | 1065 |     |     |     |
| Arg | Gly  | Pro | Ser | Leu | Arg | Thr  | Thr | Thr | Val | Thr | Gly  | Lys | Ile | Ile |
|     | 1070 |     |     |     |     | 1075 |     |     |     |     | 1080 |     |     |     |
| His | Glu  | Trp | Cys | Cys | Arg | Ser  | Cys | Thr | Leu | Pro | Pro  | Leu | Arg | Phe |
|     | 1085 |     |     |     |     | 1090 |     |     |     |     | 1095 |     |     |     |
| Lys | Gly  | Glu | Asp | Gly | Cys | Trp  | Tyr | Gly | Met | Glu | Ile  | Arg | Pro | Val |
|     | 1100 |     |     |     |     | 1105 |     |     |     |     | 1110 |     |     |     |
| Lys | Asp  | Lys | Glu | Glu | Asn | Leu  | Val | Lys | Ser | Met | Val  | Ser | Ala | Gly |
|     | 1115 |     |     |     |     | 1120 |     |     |     |     | 1125 |     |     |     |
| Ser | Gly  | Glu | Val | Asp | Ser | Phe  | Ser | Leu | Gly | Leu | Leu  | Cys | Ile | Ser |
|     | 1130 |     |     |     |     | 1135 |     |     |     |     | 1140 |     |     |     |
| Ile | Met  | Ile | Glu | Glu | Val | Met  | Arg | Ser | Arg | Trp | Ser  | Lys | Lys | Met |
|     | 1145 |     |     |     |     | 1150 |     |     |     |     | 1155 |     |     |     |
| Leu | Met  | Thr | Gly | Thr | Leu | Ala  | Val | Phe | Leu | Leu | Leu  | Ile | Met | Gly |
|     | 1160 |     |     |     |     | 1165 |     |     |     |     | 1170 |     |     |     |
| Gln | Leu  | Thr | Trp | Ser | Asp | Leu  | Ile | Arg | Leu | Cys | Ile  | Met | Val | Gly |
|     | 1175 |     |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |     |     |     |
| Ala | Asn  | Ala | Ser | Asp | Lys | Met  | Gly | Met | Gly | Thr | Thr  | Tyr | Leu | Ala |
|     | 1190 |     |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |     |     |     |
| Leu | Met  | Ala | Thr | Phe | Lys | Met  | Arg | Pro | Met | Phe | Ala  | Val | Gly | Leu |
|     | 1205 |     |     |     |     | 1210 |     |     |     |     | 1215 |     |     |     |
| Leu | Phe  | Arg | Arg | Leu | Thr | Ser  | Arg | Glu | Val | Leu | Leu  | Leu | Thr | Ile |
|     | 1220 |     |     |     |     | 1225 |     |     |     |     | 1230 |     |     |     |
| Gly | Leu  | Ser | Leu | Val | Ala | Ser  | Val | Glu | Leu | Pro | Ser  | Ser | Leu | Glu |
|     | 1235 |     |     |     |     | 1240 |     |     |     |     | 1245 |     |     |     |
| Glu | Leu  | Gly | Asp | Gly | Leu | Ala  | Ile | Gly | Ile | Met | Met  | Leu | Lys | Leu |
|     | 1250 |     |     |     |     | 1255 |     |     |     |     | 1260 |     |     |     |

|     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Leu | Thr  | Asp | Phe | Gln | Ser | His  | Gln | Leu | Trp | Ala | Thr  | Leu | Leu | Ser |
|     | 1265 |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     | 1275 |     |     |     |
| Leu | Thr  | Phe | Ile | Lys | Thr | Thr  | Phe | Ser | Leu | His | Tyr  | Ala | Trp | Lys |
|     | 1280 |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |     |     |     |
| Thr | Met  | Ala | Met | Val | Leu | Ser  | Ile | Val | Ser | Leu | Phe  | Pro | Leu | Cys |
|     | 1295 |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |     |     |     |
| Leu | Ser  | Thr | Thr | Ser | Gln | Lys  | Thr | Thr | Trp | Leu | Pro  | Val | Leu | Leu |
|     | 1310 |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     | 1320 |     |     |     |
| Gly | Ser  | Leu | Gly | Cys | Lys | Pro  | Leu | Pro | Met | Phe | Leu  | Ile | Thr | Glu |
|     | 1325 |     |     |     |     | 1330 |     |     |     |     | 1335 |     |     |     |
| Asn | Lys  | Ile | Trp | Gly | Arg | Lys  | Ser | Trp | Pro | Leu | Asn  | Glu | Gly | Ile |
|     | 1340 |     |     |     |     | 1345 |     |     |     |     | 1350 |     |     |     |
| Met | Ala  | Val | Gly | Ile | Val | Ser  | Ile | Leu | Leu | Ser | Ser  | Leu | Leu | Lys |
|     | 1355 |     |     |     |     | 1360 |     |     |     |     | 1365 |     |     |     |
| Asn | Asp  | Val | Pro | Leu | Ala | Gly  | Pro | Leu | Ile | Ala | Gly  | Gly | Met | Leu |
|     | 1370 |     |     |     |     | 1375 |     |     |     |     | 1380 |     |     |     |
| Ile | Ala  | Cys | Tyr | Val | Ile | Ser  | Gly | Ser | Ser | Ala | Asp  | Leu | Ser | Leu |
|     | 1385 |     |     |     |     | 1390 |     |     |     |     | 1395 |     |     |     |
| Glu | Lys  | Ala | Ala | Glu | Val | Ser  | Trp | Glu | Glu | Glu | Ala  | Glu | His | Ser |
|     | 1400 |     |     |     |     | 1405 |     |     |     |     | 1410 |     |     |     |
| Gly | Ala  | Ser | His | Asn | Ile | Leu  | Val | Glu | Val | Gln | Asp  | Asp | Gly | Thr |
|     | 1415 |     |     |     |     | 1420 |     |     |     |     | 1425 |     |     |     |
| Met | Lys  | Ile | Lys | Asp | Glu | Glu  | Arg | Asp | Asp | Thr | Leu  | Thr | Ile | Leu |
|     | 1430 |     |     |     |     | 1435 |     |     |     |     | 1440 |     |     |     |
| Leu | Lys  | Ala | Thr | Leu | Leu | Ala  | Val | Ser | Gly | Val | Tyr  | Pro | Met | Ser |
|     | 1445 |     |     |     |     | 1450 |     |     |     |     | 1455 |     |     |     |
| Ile | Pro  | Ala | Thr | Leu | Phe | Val  | Trp | Tyr | Phe | Trp | Gln  | Lys | Lys | Lys |
|     | 1460 |     |     |     |     | 1465 |     |     |     |     | 1470 |     |     |     |
| Gln | Arg  | Ser | Gly | Val | Leu | Trp  | Asp | Thr | Pro | Ser | Pro  | Pro | Glu | Val |
|     | 1475 |     |     |     |     | 1480 |     |     |     |     | 1485 |     |     |     |
| Glu | Arg  | Ala | Val | Leu | Asp | Asp  | Gly | Ile | Tyr | Arg | Ile  | Leu | Gln | Arg |
|     | 1490 |     |     |     |     | 1495 |     |     |     |     | 1500 |     |     |     |
| Gly | Leu  | Leu | Gly | Arg | Ser | Gln  | Val | Gly | Val | Gly | Val  | Phe | Gln | Glu |
|     | 1505 |     |     |     |     | 1510 |     |     |     |     | 1515 |     |     |     |

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Gly  | Val | Phe | His | Thr | Met | Trp  | His | Val | Thr | Arg | Gly  | Ala | Val | Leu |
| 1520 |     |     |     |     |     | 1525 |     |     |     |     | 1530 |     |     |     |
| Met  | Tyr | Gln | Gly | Lys | Arg | Leu  | Glu | Pro | Ser | Trp | Ala  | Ser | Val | Lys |
| 1535 |     |     |     |     |     | 1540 |     |     |     |     | 1545 |     |     |     |
| Lys  | Asp | Leu | Ile | Ser | Tyr | Gly  | Gly | Gly | Trp | Arg | Phe  | Gln | Gly | Ser |
| 1550 |     |     |     |     |     | 1555 |     |     |     |     | 1560 |     |     |     |
| Trp  | Asn | Thr | Gly | Glu | Glu | Val  | Gln | Val | Ile | Ala | Val  | Glu | Pro | Gly |
| 1565 |     |     |     |     |     | 1570 |     |     |     |     | 1575 |     |     |     |
| Lys  | Asn | Pro | Lys | Asn | Val | Gln  | Thr | Thr | Pro | Gly | Thr  | Phe | Lys | Thr |
| 1580 |     |     |     |     |     | 1585 |     |     |     |     | 1590 |     |     |     |
| Pro  | Glu | Gly | Glu | Val | Gly | Ala  | Ile | Ala | Leu | Asp | Phe  | Lys | Pro | Gly |
| 1595 |     |     |     |     |     | 1600 |     |     |     |     | 1605 |     |     |     |
| Thr  | Ser | Gly | Ser | Pro | Ile | Val  | Asn | Arg | Glu | Gly | Lys  | Ile | Val | Gly |
| 1610 |     |     |     |     |     | 1615 |     |     |     |     | 1620 |     |     |     |
| Leu  | Tyr | Gly | Asn | Gly | Val | Val  | Thr | Thr | Ser | Gly | Thr  | Tyr | Val | Ser |
| 1625 |     |     |     |     |     | 1630 |     |     |     |     | 1635 |     |     |     |
| Ala  | Ile | Ala | Gln | Ala | Lys | Ala  | Ser | Gln | Glu | Gly | Pro  | Leu | Pro | Glu |
| 1640 |     |     |     |     |     | 1645 |     |     |     |     | 1650 |     |     |     |
| Ile  | Glu | Asp | Lys | Val | Phe | Arg  | Lys | Arg | Asn | Leu | Thr  | Ile | Met | Asp |
| 1655 |     |     |     |     |     | 1660 |     |     |     |     | 1665 |     |     |     |
| Leu  | His | Pro | Gly | Ser | Gly | Lys  | Thr | Arg | Arg | Tyr | Leu  | Pro | Ala | Ile |
| 1670 |     |     |     |     |     | 1675 |     |     |     |     | 1680 |     |     |     |
| Val  | Arg | Glu | Ala | Ile | Lys | Arg  | Lys | Leu | Arg | Thr | Leu  | Ile | Leu | Ala |
| 1685 |     |     |     |     |     | 1690 |     |     |     |     | 1695 |     |     |     |
| Pro  | Thr | Arg | Val | Val | Ala | Ser  | Glu | Met | Ala | Glu | Ala  | Leu | Lys | Gly |
| 1700 |     |     |     |     |     | 1705 |     |     |     |     | 1710 |     |     |     |
| Val  | Pro | Ile | Arg | Tyr | Gln | Thr  | Thr | Ala | Val | Lys | Ser  | Glu | His | Thr |
| 1715 |     |     |     |     |     | 1720 |     |     |     |     | 1725 |     |     |     |
| Gly  | Lys | Glu | Ile | Val | Asp | Leu  | Met | Cys | His | Ala | Thr  | Phe | Thr | Met |
| 1730 |     |     |     |     |     | 1735 |     |     |     |     | 1740 |     |     |     |
| Arg  | Leu | Leu | Ser | Pro | Val | Arg  | Val | Pro | Asn | Tyr | Asn  | Met | Ile | Ile |
| 1745 |     |     |     |     |     | 1750 |     |     |     |     | 1755 |     |     |     |
| Met  | Asp | Glu | Ala | His | Phe | Thr  | Asp | Pro | Ala | Ser | Ile  | Ala | Ala | Arg |
| 1760 |     |     |     |     |     | 1765 |     |     |     |     | 1770 |     |     |     |

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Gly  | Tyr | Ile | Ser | Thr | Arg | Val  | Gly | Met | Gly | Glu | Ala  | Ala | Ala | Ile |
| 1775 |     |     |     |     |     | 1780 |     |     |     |     | 1785 |     |     |     |
| Phe  | Met | Thr | Ala | Thr | Pro | Pro  | Gly | Ser | Val | Glu | Ala  | Phe | Pro | Gln |
| 1790 |     |     |     |     |     | 1795 |     |     |     |     | 1800 |     |     |     |
| Ser  | Asn | Ala | Ile | Ile | Gln | Asp  | Glu | Glu | Arg | Asp | Ile  | Pro | Glu | Arg |
| 1805 |     |     |     |     |     | 1810 |     |     |     |     | 1815 |     |     |     |
| Ser  | Trp | Asn | Ser | Gly | Tyr | Asp  | Trp | Ile | Thr | Asp | Phe  | Pro | Gly | Lys |
| 1820 |     |     |     |     |     | 1825 |     |     |     |     | 1830 |     |     |     |
| Thr  | Val | Trp | Phe | Val | Pro | Ser  | Ile | Lys | Ser | Gly | Asn  | Asp | Ile | Ala |
| 1835 |     |     |     |     |     | 1840 |     |     |     |     | 1845 |     |     |     |
| Asn  | Cys | Leu | Arg | Lys | Asn | Gly  | Lys | Arg | Val | Ile | Gln  | Leu | Ser | Arg |
| 1850 |     |     |     |     |     | 1855 |     |     |     |     | 1860 |     |     |     |
| Lys  | Thr | Phe | Asp | Thr | Glu | Tyr  | Gln | Lys | Thr | Lys | Asn  | Asn | Asp | Trp |
| 1865 |     |     |     |     |     | 1870 |     |     |     |     | 1875 |     |     |     |
| Asp  | Tyr | Val | Val | Thr | Thr | Asp  | Ile | Ser | Glu | Met | Gly  | Ala | Asn | Phe |
| 1880 |     |     |     |     |     | 1885 |     |     |     |     | 1890 |     |     |     |
| Arg  | Ala | Asp | Arg | Val | Ile | Asp  | Pro | Arg | Arg | Cys | Leu  | Lys | Pro | Val |
| 1895 |     |     |     |     |     | 1900 |     |     |     |     | 1905 |     |     |     |
| Ile  | Leu | Lys | Asp | Gly | Pro | Glu  | Arg | Val | Ile | Leu | Ala  | Gly | Pro | Met |
| 1910 |     |     |     |     |     | 1915 |     |     |     |     | 1920 |     |     |     |
| Pro  | Val | Thr | Val | Ala | Ser | Ala  | Ala | Gln | Arg | Arg | Gly  | Arg | Ile | Gly |
| 1925 |     |     |     |     |     | 1930 |     |     |     |     | 1935 |     |     |     |
| Arg  | Asn | Gln | Asn | Lys | Glu | Gly  | Asp | Gln | Tyr | Ile | Tyr  | Met | Gly | Gln |
| 1940 |     |     |     |     |     | 1945 |     |     |     |     | 1950 |     |     |     |
| Pro  | Leu | Lys | Asn | Asp | Glu | Asp  | His | Ala | His | Trp | Thr  | Glu | Ala | Lys |
| 1955 |     |     |     |     |     | 1960 |     |     |     |     | 1965 |     |     |     |
| Met  | Leu | Leu | Asp | Asn | Ile | Asn  | Thr | Pro | Glu | Gly | Ile  | Ile | Pro | Ala |
| 1970 |     |     |     |     |     | 1975 |     |     |     |     | 1980 |     |     |     |
| Leu  | Phe | Glu | Pro | Glu | Arg | Glu  | Lys | Ser | Ala | Ala | Ile  | Asp | Gly | Glu |
| 1985 |     |     |     |     |     | 1990 |     |     |     |     | 1995 |     |     |     |
| Tyr  | Arg | Leu | Arg | Gly | Glu | Ala  | Arg | Lys | Thr | Phe | Val  | Glu | Leu | Met |
| 2000 |     |     |     |     |     | 2005 |     |     |     |     | 2010 |     |     |     |
| Arg  | Arg | Gly | Asp | Leu | Pro | Val  | Trp | Leu | Ser | Tyr | Lys  | Val | Ala | Ser |
| 2015 |     |     |     |     |     | 2020 |     |     |     |     | 2025 |     |     |     |

Glu Gly Phe Gln Tyr Ser Asp Arg Arg Trp Cys Phe Asp Gly Glu  
 2030 2035 2040  
 Arg Asn Asn Gln Val Leu Glu Glu Asn Met Asp Val Glu Ile Trp  
 2045 2050 2055  
 Thr Lys Glu Gly Glu Arg Lys Lys Leu Arg Pro Arg Trp Leu Asp  
 2060 2065 2070  
 Ala Arg Thr Tyr Ser Asp Pro Leu Ala Leu Arg Glu Phe Lys Glu  
 2075 2080 2085  
 Phe Ala Ala Gly Arg Arg Ser Val Ser Gly Asp Leu Ile Leu Glu  
 2090 2095 2100  
 Ile Gly Lys Leu Pro Gln His Leu Thr Gln Arg Ala Gln Asn Ala  
 2105 2110 2115  
 Leu Asp Asn Leu Val Met Leu His Asn Ser Glu Gln Gly Gly Lys  
 2120 2125 2130  
 Ala Tyr Arg His Ala Met Glu Glu Leu Pro Asp Thr Ile Glu Thr  
 2135 2140 2145  
 Leu Met Leu Leu Ala Leu Ile Ala Val Leu Thr Gly Gly Val Thr  
 2150 2155 2160  
 Leu Phe Phe Leu Ser Gly Arg Gly Leu Gly Lys Thr Ser Ile Gly  
 2165 2170 2175  
 Leu Leu Cys Val Met Ala Ser Ser Ala Leu Leu Trp Met Ala Ser  
 2180 2185 2190  
 Val Glu Pro His Trp Ile Ala Ala Ser Ile Ile Leu Glu Phe Phe  
 2195 2200 2205  
 Leu Met Val Leu Leu Ile Pro Glu Pro Asp Arg Gln Arg Thr Pro  
 2210 2215 2220  
 Gln Asp Asn Gln Leu Ala Tyr Val Val Ile Gly Leu Leu Phe Val  
 2225 2230 2235  
 Ile Leu Thr Val Ala Ala Asn Glu Met Gly Leu Leu Glu Thr Thr  
 2240 2245 2250  
 Lys Lys Asp Leu Gly Ile Gly His Val Ala Ala Glu Asn His His  
 2255 2260 2265  
 His Ala Thr Met Leu Asp Val Asp Leu His Pro Ala Ser Ala Trp  
 2270 2275 2280

Thr Leu Tyr Ala Val Ala Thr Thr Ile Ile Thr Pro Met Met Arg  
 2285 2290 2295  
 His Thr Ile Glu Asn Thr Thr Ala Asn Ile Ser Leu Thr Ala Ile  
 2300 2305 2310  
 Ala Asn Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Leu Asp Lys Gly Trp Pro  
 2315 2320 2325  
 Ile Ser Lys Met Asp Ile Gly Val Pro Leu Leu Ala Leu Gly Cys  
 2330 2335 2340  
 Tyr Ser Gln Val Asn Pro Leu Thr Leu Ile Ala Ala Val Leu Met  
 2345 2350 2355  
 Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Ile Gly Pro Gly Leu Gln Ala Lys  
 2360 2365 2370  
 Ala Thr Arg Glu Ala Gln Lys Arg Thr Ala Ala Gly Ile Met Lys  
 2375 2380 2385  
 Asn Pro Thr Val Asp Gly Ile Val Ala Ile Asp Leu Asp Pro Val  
 2390 2395 2400  
 Val Tyr Asp Ala Lys Phe Glu Lys Gln Leu Gly Gln Ile Met Leu  
 2405 2410 2415  
 Leu Ile Leu Cys Thr Ser Gln Ile Leu Leu Met Arg Thr Thr Trp  
 2420 2425 2430  
 Ala Leu Cys Glu Ser Ile Thr Leu Ala Thr Gly Pro Leu Thr Thr  
 2435 2440 2445  
 Leu Trp Glu Gly Ser Pro Gly Lys Phe Trp Asn Thr Thr Ile Ala  
 2450 2455 2460  
 Val Ser Met Ala Asn Ile Phe Arg Gly Ser Tyr Leu Ala Gly Ala  
 2465 2470 2475  
 Gly Leu Ala Phe Ser Leu Met Lys Ser Leu Gly Gly Gly Arg Arg  
 2480 2485 2490  
 Gly Thr Gly Ala Gln Gly Glu Thr Leu Gly Glu Lys Trp Lys Arg  
 2495 2500 2505  
 Gln Leu Asn Gln Leu Ser Lys Ser Glu Phe Asn Thr Tyr Lys Arg  
 2510 2515 2520  
 Ser Gly Ile Met Glu Val Asp Arg Ser Glu Ala Lys Glu Gly Leu  
 2525 2530 2535

Lys Arg Gly Glu Thr Thr Lys His Ala Val Ser Arg Gly Thr Ala  
2540 2545 2550

Lys Leu Arg Trp Phe Val Glu Arg Asn Leu Val Lys Pro Glu Gly  
2555 2560 2565

Lys Val Ile Asp Leu Gly Cys Gly Arg Gly Gly Trp Ser Tyr Tyr  
2570 2575 2580

Cys Ala Gly Leu Lys Lys Val Thr Glu Val Lys Gly Tyr Thr Lys  
2585 2590 2595

Gly Gly Pro Gly His Glu Glu Pro Ile Pro Met Ala Thr Tyr Gly  
2600 2605 2610

Trp Asn Leu Val Arg Leu His Ser Gly Lys Asp Val Phe Phe Ile  
2615 2620 2625

Pro Pro Glu Lys Cys Asp Thr Leu Leu Cys Asp Ile Gly Glu Ser  
2630 2635 2640

Ser Pro Asn Pro Thr Ile Glu Glu Gly Arg Thr Leu Arg Val Leu  
2645 2650 2655

Lys Met Val Glu Pro Trp Leu Arg Gly Asn Gln Phe Cys Ile Lys  
2660 2665 2670

Ile Leu Asn Pro Tyr Met Pro Ser Val Val Glu Thr Leu Glu Gln  
2675 2680 2685

Met Gln Arg Lys His Gly Gly Met Leu Val Arg Asn Pro Leu Ser  
2690 2695 2700

Arg Asn Ser Thr His Glu Met Tyr Trp Val Ser Cys Gly Thr Gly  
2705 2710 2715

Asn Ile Val Ser Ala Val Asn Met Thr Ser Arg Met Leu Leu Asn  
2720 2725 2730

Arg Phe Thr Met Ala His Arg Lys Pro Thr Tyr Glu Arg Asp Val  
2735 2740 2745

Asp Leu Gly Ala Gly Thr Arg His Val Ala Val Glu Pro Glu Val  
2750 2755 2760

Ala Asn Leu Asp Ile Ile Gly Gln Arg Ile Glu Asn Ile Lys Asn  
2765 2770 2775

Glu His Lys Ser Thr Trp His Tyr Asp Glu Asp Asn Pro Tyr Lys  
2780 2785 2790

|     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Thr | Trp  | Ala | Tyr | His | Gly | Ser  | Tyr | Glu | Val | Lys | Pro  | Ser | Gly | Ser |
|     | 2795 |     |     |     |     | 2800 |     |     |     |     | 2805 |     |     |     |
| Ala | Ser  | Ser | Met | Val | Asn | Gly  | Val | Val | Arg | Leu | Leu  | Thr | Lys | Pro |
|     | 2810 |     |     |     |     | 2815 |     |     |     |     | 2820 |     |     |     |
| Trp | Asp  | Val | Ile | Pro | Met | Val  | Thr | Gln | Ile | Ala | Met  | Thr | Asp | Thr |
|     | 2825 |     |     |     |     | 2830 |     |     |     |     | 2835 |     |     |     |
| Thr | Pro  | Phe | Gly | Gln | Gln | Arg  | Val | Phe | Lys | Glu | Lys  | Val | Asp | Thr |
|     | 2840 |     |     |     |     | 2845 |     |     |     |     | 2850 |     |     |     |
| Arg | Thr  | Pro | Lys | Ala | Lys | Arg  | Gly | Thr | Ala | Gln | Ile  | Met | Glu | Val |
|     | 2855 |     |     |     |     | 2860 |     |     |     |     | 2865 |     |     |     |
| Thr | Ala  | Arg | Trp | Leu | Trp | Gly  | Phe | Leu | Ser | Arg | Asn  | Lys | Lys | Pro |
|     | 2870 |     |     |     |     | 2875 |     |     |     |     | 2880 |     |     |     |
| Arg | Ile  | Cys | Thr | Arg | Glu | Glu  | Phe | Thr | Arg | Lys | Val  | Arg | Ser | Asn |
|     | 2885 |     |     |     |     | 2890 |     |     |     |     | 2895 |     |     |     |
| Ala | Ala  | Ile | Gly | Ala | Val | Phe  | Val | Asp | Glu | Asn | Gln  | Trp | Asn | Ser |
|     | 2900 |     |     |     |     | 2905 |     |     |     |     | 2910 |     |     |     |
| Ala | Lys  | Glu | Ala | Val | Glu | Asp  | Glu | Arg | Phe | Trp | Glu  | Leu | Val | His |
|     | 2915 |     |     |     |     | 2920 |     |     |     |     | 2925 |     |     |     |
| Arg | Glu  | Arg | Glu | Leu | His | Lys  | Gln | Gly | Lys | Cys | Ala  | Thr | Cys | Val |
|     | 2930 |     |     |     |     | 2935 |     |     |     |     | 2940 |     |     |     |
| Tyr | Asn  | Met | Met | Gly | Lys | Arg  | Glu | Lys | Lys | Leu | Gly  | Glu | Phe | Gly |
|     | 2945 |     |     |     |     | 2950 |     |     |     |     | 2955 |     |     |     |
| Lys | Ala  | Lys | Gly | Ser | Arg | Ala  | Ile | Trp | Tyr | Met | Trp  | Leu | Gly | Ala |
|     | 2960 |     |     |     |     | 2965 |     |     |     |     | 2970 |     |     |     |
| Arg | Phe  | Leu | Glu | Phe | Glu | Ala  | Leu | Gly | Phe | Met | Asn  | Glu | Asp | His |
|     | 2975 |     |     |     |     | 2980 |     |     |     |     | 2985 |     |     |     |
| Trp | Phe  | Ser | Arg | Glu | Asn | Ser  | Leu | Ser | Gly | Val | Glu  | Gly | Glu | Gly |
|     | 2990 |     |     |     |     | 2995 |     |     |     |     | 3000 |     |     |     |
| Leu | His  | Lys | Leu | Gly | Tyr | Ile  | Leu | Arg | Asp | Ile | Ser  | Arg | Ile | Pro |
|     | 3005 |     |     |     |     | 3010 |     |     |     |     | 3015 |     |     |     |
| Gly | Gly  | Asn | Met | Tyr | Ala | Asp  | Asp | Thr | Ala | Gly | Trp  | Asp | Thr | Arg |
|     | 3020 |     |     |     |     | 3025 |     |     |     |     | 3030 |     |     |     |
| Ile | Thr  | Glu | Asp | Asp | Leu | Gln  | Asn | Glu | Ala | Lys | Ile  | Thr | Asp | Ile |
|     | 3035 |     |     |     |     | 3040 |     |     |     |     | 3045 |     |     |     |

|     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Met | Glu  | Pro | Glu | His | Ala | Leu  | Leu | Ala | Thr | Ser | Ile  | Phe | Lys | Leu |
|     | 3050 |     |     |     |     | 3055 |     |     |     |     | 3060 |     |     |     |
| Thr | Tyr  | Gln | Asn | Lys | Val | Val  | Arg | Val | Gln | Arg | Pro  | Ala | Lys | Asn |
|     | 3065 |     |     |     |     | 3070 |     |     |     |     | 3075 |     |     |     |
| Gly | Thr  | Val | Met | Asp | Val | Ile  | Ser | Arg | Arg | Asp | Gln  | Arg | Gly | Ser |
|     | 3080 |     |     |     |     | 3085 |     |     |     |     | 3090 |     |     |     |
| Gly | Gln  | Val | Gly | Thr | Tyr | Gly  | Leu | Asn | Thr | Phe | Thr  | Asn | Met | Glu |
|     | 3095 |     |     |     |     | 3100 |     |     |     |     | 3105 |     |     |     |
| Ala | Gln  | Leu | Ile | Arg | Gln | Met  | Glu | Ser | Glu | Gly | Ile  | Phe | Leu | Pro |
|     | 3110 |     |     |     |     | 3115 |     |     |     |     | 3120 |     |     |     |
| Ser | Glu  | Leu | Glu | Thr | Pro | Asn  | Leu | Ala | Gly | Arg | Val  | Leu | Asp | Trp |
|     | 3125 |     |     |     |     | 3130 |     |     |     |     | 3135 |     |     |     |
| Leu | Glu  | Lys | Tyr | Gly | Val | Glu  | Arg | Leu | Lys | Arg | Met  | Ala | Ile | Ser |
|     | 3140 |     |     |     |     | 3145 |     |     |     |     | 3150 |     |     |     |
| Gly | Asp  | Asp | Cys | Val | Val | Lys  | Pro | Ile | Asp | Asp | Arg  | Phe | Ala | Thr |
|     | 3155 |     |     |     |     | 3160 |     |     |     |     | 3165 |     |     |     |
| Ala | Leu  | Thr | Ala | Leu | Asn | Asp  | Met | Gly | Lys | Val | Arg  | Lys | Asp | Ile |
|     | 3170 |     |     |     |     | 3175 |     |     |     |     | 3180 |     |     |     |
| Pro | Gln  | Trp | Glu | Pro | Ser | Lys  | Gly | Trp | Asn | Asp | Trp  | Gln | Gln | Val |
|     | 3185 |     |     |     |     | 3190 |     |     |     |     | 3195 |     |     |     |
| Pro | Phe  | Cys | Ser | His | His | Phe  | His | Gln | Leu | Ile | Met  | Lys | Asp | Gly |
|     | 3200 |     |     |     |     | 3205 |     |     |     |     | 3210 |     |     |     |
| Arg | Glu  | Ile | Val | Val | Pro | Cys  | Arg | Asn | Gln | Asp | Glu  | Leu | Val | Gly |
|     | 3215 |     |     |     |     | 3220 |     |     |     |     | 3225 |     |     |     |
| Arg | Ala  | Arg | Val | Ser | Gln | Gly  | Ala | Gly | Trp | Ser | Leu  | Arg | Glu | Thr |
|     | 3230 |     |     |     |     | 3235 |     |     |     |     | 3240 |     |     |     |
| Ala | Cys  | Leu | Gly | Lys | Ser | Tyr  | Ala | Gln | Met | Trp | Gln  | Leu | Met | Tyr |
|     | 3245 |     |     |     |     | 3250 |     |     |     |     | 3255 |     |     |     |
| Phe | His  | Arg | Arg | Asp | Leu | Arg  | Leu | Ala | Ala | Asn | Ala  | Ile | Cys | Ser |
|     | 3260 |     |     |     |     | 3265 |     |     |     |     | 3270 |     |     |     |
| Ala | Val  | Pro | Val | Asp | Trp | Val  | Pro | Thr | Ser | Arg | Thr  | Thr | Trp | Ser |
|     | 3275 |     |     |     |     | 3280 |     |     |     |     | 3285 |     |     |     |
| Ile | His  | Ala | His | His | Gln | Trp  | Met | Thr | Thr | Glu | Asp  | Met | Leu | Ser |
|     | 3290 |     |     |     |     | 3295 |     |     |     |     | 3300 |     |     |     |

Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Glu Glu Asn Pro Trp Met Glu Asp  
3305 3310 3315

Lys Thr His Val Ser Ser Trp Glu Glu Val Pro Tyr Leu Gly Lys  
3320 3325 3330

Arg Glu Asp Gln Trp Cys Gly Ser Leu Ile Gly Leu Thr Ala Arg  
3335 3340 3345

Ala Thr Trp Ala Thr Asn Ile Gln Val Ala Ile Asn Gln Val Arg  
3350 3355 3360

Arg Leu Ile Gly Asn Glu Asn Tyr Leu Asp Tyr Met Thr Ser Met  
3365 3370 3375

Lys Arg Phe Lys Asn Glu Ser Asp Pro Glu Gly Ala Leu Trp  
3380 3385 3390

<210> 42  
<211> 10723  
<212> DNA  
<213> Virus da Dengue

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(10723)  
<223> LAV2

<400> 42  
agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaatgta 60  
gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120  
aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgcaacag 180  
ctgacaaaga gattctcact tggaatgctg caggagcag gaccattaaa actgttcattg 240  
gccctggtgg cggtccttcg tttcctaaca atcccaccaa cagcagggat attgaagaga 300  
tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gagggttcag gaaagagatt 360  
ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg 420  
attccaacag tgatggcggt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgtc 480  
agcagacaag agaaagggaa aagtcttctg tttaaaacag aggttggcgt gaacatgtgt 540  
accctcatgg ccatggacct tggatgaattg tgtgaagaca caatcacgta caagtgtccc 600  
cttctcaggc agaatgagcc agaagacata gactgttggt gcaactctac gtccacgtgg 660  
gtaacttatg ggacgtgtac caccatggga gaacatagaa gagaaaaaag atcagtggca 720  
ctcgttccac atgtgggaat gggactggag acacgaactg aaacatggat gtcacagaa 780  
ggggcctgga aacatgtcca gagaattgaa acttgatct tgagacatcc aggccttcacc 840  
atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttccaaag agccctgatt 900

|            |            |            |             |             |            |      |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ttcatcttac | tgacagctgt | cactccttca | atgacaatgc  | gttgcatagg  | aatgtcaaat | 960  |
| agagactttg | tggaaggggt | ttcaggagga | agctgggttg  | acatagtctt  | agaacatgga | 1020 |
| agctgtgtga | cgacgatggc | aaaaaacaaa | ccaacattgg  | atgtttgaact | gataaaaaca | 1080 |
| gaagcctaac | agcctgccac | cctaaggaag | tactgtatag  | aggcaaagct  | aaccaacaca | 1140 |
| acaacagaat | ctcgctgccc | aacacaaggg | gaacccagcc  | taaatgaaga  | gcaggacaaa | 1200 |
| aggttcgtct | gcaaacactc | catggtagac | agaggatggg  | gaaatggatg  | tggactattt | 1260 |
| ggaaagggag | gcattgtgac | ctgtgctatg | ttcagatgca  | aaaagaacat  | ggaaggaaaa | 1320 |
| gttgtgcaac | cagaaaactt | ggaatacacc | atttgtgataa | cacctcactc  | 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  | ccggagcgga  | cacacaaggg | 1620 |
| tcaaattgga | tacagaaaga | gacattggtc | actttcaaaa  | atccccatgc  | gaagaaacag | 1680 |
| gatgttggtg | 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 | cccaattgtg | 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  | tggaattgtg  | gacactgtat | 2400 |
| ttgggagtca | tggtgcaggc | cgatagtggg | tgcgttgtga  | gctggaaaaa  | caaagaactg | 2460 |
| aaatgtggca | gtgggatttt | catcacagac | aacgtgcaca  | catggacaga  | acaatacaag | 2520 |
| ttccaaccag | aatccccctc | aaaactagct | tcagctatcc  | agaaagccca  | tgaagaggac | 2580 |
| atgtgtggaa | tccgctcagt | aacaagactg | gagaatctga  | tgtggaaaca  | aataacacca | 2640 |
| gaattgaatc | acattctatc | agaaaatgag | gtgaagttaa  | ctattatgac  | aggagacatc | 2700 |
| aaaggaatca | tgcaggcagg | aaaacgatct | ctgcggcctc  | agccccactg  | gctgaagtat | 2760 |
| tcatggaaaa | catggggcaa | agcaaaaatg | ctctctacag  | agtctcataa  | ccagaccttt | 2820 |
| ctcattgatg | gccccgaaac | agcagaatgc | cccaacacaa  | atagagcttg  | gaattcggtg | 2880 |
| gaagttgaag | actatggctt | tggagtattc | accaccaata  | tatggctaaa  | attgaaagaa | 2940 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aaacaggatg tattctgcga ctcaaaactc atgtcagcgg ccataaaaga caacagagcc  | 3000 |
| gtccatgccc 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 aggtaagctt  | 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 actccttggc cacagctgga | 3480 |
| catgggcagg tcgacaactt ttcactagga gtcttgggaa tggcattgtt cctggaggaa  | 3540 |
| atgcttagga cccgagtagg aacgaaacat gcaatactac tagttgcagt ttcttttctg  | 3600 |
| acattgatca cagggaacat gtcctttaga gacctgggaa gagtgatggt tatggtaggc  | 3660 |
| gccactatga cggatgacat aggtatgggc gtgacttatac ttgccctact agcagccttc | 3720 |
| aaagtcagac caacttttgc agctggacta ctcttgagaa agctgacctc caaggaattg  | 3780 |
| atgatgacta ctataggaat tgtactctc tcccagagca ccataccaga gaccattctt   | 3840 |
| gagttgactg atgcgttagc cttaggcatg atggtcctca aaatggtgag aaatatggaa  | 3900 |
| aagtatcaat tggcagtgac tatcatggct atcttgtgcg tcccaaacgc agtgatatta  | 3960 |
| caaaacgcat ggaaagtgag ttgcacaata ttggcagtggt tgtccgtttc cccactgttc | 4020 |
| ttaacatcct cacagcaaaa aacagattgg ataccattag cattgacgat caaaggcttc  | 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 aactgacca tactcattag aacaggattg   | 4440 |
| ctggtgatct caggactttt tcctgtatca ataccaatca cggcagcagc atggtacctg  | 4500 |
| tgggaagtga agaaacaacg ggccggagta ttgtgggatg ttccttcacc cccacccatg  | 4560 |
| ggaaaggctg aactggaaga tggagcctat agaattaagc aaaaagggat tcttgatat   | 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 |
| gacacccag   | agatcgaaga | tgacattttc  | cgaaagagaa  | gactgaccat  | catggacctc | 5100 |
| caccaggag   | 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  | agtataaaaag | caggaaatga  | tatagcagct | 5640 |
| tgcctgagga  | aaaatggaaa | gaaagtgata  | caactcagta  | ggaagacctt  | tgattctgag | 5700 |
| tatgtcaaga  | ctagaaccaa | tgattgggac  | ttcgtgggta  | caactgacat  | ttcagaaatg | 5760 |
| ggtgccaat   | tcaaggctga | gaggggtata  | gaccccagac  | gctgcatgaa  | accagtcata | 5820 |
| ctaacagatg  | gtgaagagcg | ggtgattctg  | gcaggaccta  | tgccagtgc   | ccactctagt | 5880 |
| gcagcacaaa  | gaagagggag | aataggaaga  | aatccaaaaa  | atgagaatga  | ccagtacata | 5940 |
| tacatggggg  | aacctctgga | aaatgatgaa  | gactgtgcac  | actggaaaga  | agctaaaatg | 6000 |
| ctcctagata  | acatcaacac | gccagaagga  | atcattccta  | gcatgttcga  | accagagcgt | 6060 |
| gaaaagggtg  | atgccattga | tggcgaatac  | cgcttgagag  | gagaagcaag  | gaaaaccttt | 6120 |
| gtagacttaa  | tgagaagagg | agacctacca  | gtctggttgg  | cctacagagt  | ggcagctgaa | 6180 |
| ggcatcaact  | acgcagacag | aagggtggtg  | tttgatggag  | tcaagaacaa  | ccaaatccta | 6240 |
| gaagaaaacg  | tggaagttga | aatctggaca  | aaagaagggg  | aaaggaagaa  | attgaaaccc | 6300 |
| agatggtttg  | atgctaggat | ctattctgac  | ccactggcgc  | taaaagaatt  | taaggaattt | 6360 |
| gcagccggaa  | gaaagtctct | gaccctgaac  | ctaatacacag | aaatgggtag  | gctcccaacc | 6420 |
| ttcatgactc  | agaaggcaag | agacgcactg  | gacaacttag  | cagtgtctgca | cacggctgag | 6480 |
| gcaggtggaa  | gggcgtacaa | ccatgctctc  | agtgaactgc  | cggagaccct  | ggagacattg | 6540 |
| cttttactga  | cacttctggc | tacagtcacg  | ggagggatct  | ttttattctt  | gatgagcgca | 6600 |
| aggggcatag  | ggaagatgac | cctgggaatg  | tgctgcataa  | tcacggctag  | cattctccta | 6660 |
| tgggtacgcac | aaatacagcc | acactggata  | gcagcttcaa  | taatactgga  | gttttttctc | 6720 |
| atagttttgc  | ttattccaga | acctgaaaaa  | cagagaacac  | cccaagacaa  | ccaactgacc | 6780 |
| tacgttgtca  | 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 |
| aagatygaca tcggagttcc ctttctcgcc attggatgct actcacaagt caaccccata | 7140 |
| actctcacag cagctctttt cttatttgta gcacattatg ccatcatagg gccaggactc | 7200 |
| caagcāaaag caaccagaga agctcagaaa agagcagcgg cgggcatcat gaaaaacca  | 7260 |
| actgtcgatg gaataacagt gattgaccta gatccaatac cttatgatcc aaagtttgaa | 7320 |
| aagcagttgg gacaagtaat gctcctagtc ctctgctgta ctcaagtatt gatgatgagg | 7380 |
| actacatggg ctctgtgtga ggctttaacc ttagctaccg ggcccatctc cacattgtgg | 7440 |
| gaaggaaatc cagggaggtt 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 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 catcccgcca | 7980 |
| gaaaagtgtg acacattatt gtgtgacata ggggagtcac caccaaatcc cacagtggaa | 8040 |
| gcaggacgaa cactcagagt ccttaactta gtagaaaatt ggttgaacaa caacactcaa | 8100 |
| ttttgcataa aggttctcaa 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 taccaaact agatataatt  | 8400 |
| gggaaaagaa tagaaaaaat aaagcaagag catgaaacat catggcacta tgaccaagac | 8460 |
| cacccataca aaacgtgggc ataccatggt agctatgaaa caaacagac tggatcagca  | 8520 |
| tcatccatgg tcaacggagt ggctcaggctg ctgacaaaac cttgggacgt tgtcccatg | 8580 |
| gtgacacaga tggcaatgac agacacgact ccatttggac aacagcgcgt ttttaaagag | 8640 |
| aaagtggaca cgagaaccca agaaccgaaa gaaggcacga agaaactaat gaaaataaca | 8700 |
| gcagagtggc tttggaaaga attagggag aaaaagacac ccaggatgtg caccagagaa  | 8760 |
| gaattcacia gaaaggtgag aagcaatgca gccttggggg ccatattcac tgatgagaac | 8820 |
| aagtggaggt 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
attctdāagag acgtgagcaa gaaagagggg ggagcaatgt atgccgatga caccgcagga 9180
tgggatacaa gaatcacact agaagaccta aaaaatgaag aaatggtaac aaaccacatg 9240
gaaggāgaac acaagaaact agccgaggcc attttcaaac taacgtacca aaacaagggtg 9300
gtgctgtgtgc aaagaccaac accaagaggc acagtaatgg acatcataatc 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 aaaccttttag atgacagggt cgcaagcgct 9600
ttaacagctc taaatgacat gggaaagatt aggaaagaca tacaacaatg ggaaccttca 9660
agaggatgga atgattggac acaagtgcc tctgtttcac accattttcca tgagttaatc 9720
atgaaagacg gtcgctgact cgttggtcca tgtagaaacc aagatgaact gattggcaga 9780
gcccgaatct cccaaggagc aggggtggtct ttgcgggaga 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 ccaatggtgc ggctcattga ttgggttaac aagcagggcc 10140
acctgggcaa agaacatcca agcagcaata aatcaagtta gatcccttat aggcaatgaa 10200
gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaagcagga 10260
gttctgtggt agaaagcaaa actaacatga aacaaggcta gaagtcaggt cggattaagc 10320
catagtacgg aaaaaactat gctacctgtg agccccgtcc aaggacgta aaagaagtca 10380
ggccatcata aatgccatag cttgagtaaa ctatgcagcc ttagctcca cctgagaagg 10440
tgtaaaaaat cggggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc 10500
ggttagagga gaccctccc 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> 43
<211> 10699
<212> DNA
<213> Virus da Dengue

```

```

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

```

<400> 43  
 agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgact cggaagcttg cttaacgtag 60  
 tgctgacagt tttttattag agagcagatc tctgatgaac aaccaacgga aaaagacggg 120  
 aaaaccgtct atcaatatgc tgaaacgcgt gagaaaccgt gtgtcaactg gatcacagtt 180  
 ggcaagaga ttctcaagag gattgctgaa cggccaagga ccaatgaaat tggttatggc 240  
 atttatagct ttcttcagat ttctagccat tccaccgaca gcaggagtct tggctagatg 300  
 gggtagcttt aagaagtcgg gggctattaa ggtcttaaaa ggcttcaaga aggagatctc 360  
 aaacatgctg agcattatca acaaacggaa aaagacatcg ctctgtctca tgatgatgtt 420  
 accagcaaca cttgcttttc 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  
 agtccccat gttggcatgg gactggacac acgcactcaa acctggatgt cggctgaagg 780  
 agcttgaga caagtcgaga aggtagagac atggggcctt aggcacccag ggtttaccat 840  
 actagcccta tttcttgccc attacatagg cacttccttg acccagaaaag 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 taaggaagct atgcattgag ggaaaaatta ccaacataac 1140  
 aaccgactca agatgtccca cccaagggga agcgatttta cctgaggagc aggaccagaa 1200  
 ctacgtgtgt aagcatacat acgtggacag aggctgggga aacggttggt gtttgtttgg 1260  
 caaggggaagc ttggtgacat gcgcgaaatt tcaatgttta gaatcaatag agggaaaagt 1320  
 ggtgcaacat gagaacctca aatacaccgt catcatcaca gtgcacacag gagaccaaca 1380  
 ccagggtggga aatgaaacgc agggagtcac ggctgagata acaccccagg catcaaccgc 1440  
 tgaagccatt ttacctgaat atggaaccct cgggctagaa tgctcaccac ggacaggttt 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 gagtaciaaag ggaaagatgc 1920  
 accctgcaag attcctttct ccacggagga tggacaagga aaagctcaca atggcagact 1980  
 gatcacagcc aatccagtgg tgaccaagaa ggaggagcct gtcaacattg aggtgaacc 2040

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tccttttga gaaagtaaca tagtaattgg aattggagac aaagccctga aaatcaactg   | 2100 |
| gtacāagaag ggaagctcga ttgggaagat gttcgaggct actgccagag gtgcaaggcg  | 2160 |
| catggccatc ttgggagaca cagcctggga ctttgatca gtgggtggtg ttttgaattc   | 2220 |
| attagggaaa atggtccacc aaatatttgg gagtgcttac acagccctat ttggtggagt  | 2280 |
| ctcctggatg atgaaaattg gaataggtgt cctcttaacc tggatagggt tgaactcaaa  | 2340 |
| aaatactttct atgtcatttt catgcatcgc gataggaatc attacactct atctgggagc | 2400 |
| cgtggtgcaa gctgacatgg ggtgtgtcat aaactggaaa ggcaaagaac tcaaatgtgg  | 2460 |
| aagtggaatt ttcgtcacta atgaggtcca cacctggaca gagcaatata aatttcaagc  | 2520 |
| agactcccc aagagactgg caacagccat tgcaggcgct tgggaaaatg gagtgtgcgg   | 2580 |
| aattaggtca acaaccagaa tggagaacct cttgtggaag caaatagcca atgaactgaa  | 2640 |
| ttacatatta tgggaaaaca acattaaatt aacggtagtt gtaggcgaca taactggggt  | 2700 |
| cttagagcaa gggaaaagaa cactaacacc acaacccatg gagctaaaat attcttgaa   | 2760 |
| aacatgggga aaggcaaaaa tagtgacagc tgaaacacaa aattcctctt tcataataga  | 2820 |
| tgggccaaagc acaccggagt gtccaagtgc ctcaagagca tggaatgtgt gggaggtgga | 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 ccatttctgc aacacaacca  | 3180 |
| caggccccggg taccacaccc aaacggcagg accctggcac ttaggaaaat tggagctgga | 3240 |
| cttcaactat tgtgaaggaa caacagttgt catctcagaa aactgtggga caagaggccc  | 3300 |
| atcattgaga acaacaacgg tgtcaggga gttgatacac gaatggtgct gccgctcgtg   | 3360 |
| cacacttcct cccctacgat acatgggaga agacggctgc tggatatgga 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 ataattgattg ggtccaacgc | 3660 |
| ctctgacaga atggggatgg gcgtcactta cctagctcta attgcaacat ttaaaattca  | 3720 |
| gccactcctg gctttgggat tcttcctgag gaaactgaca tctagagaaa atttattgct  | 3780 |
| gggagttggg ttggccatgg cagcaacgtt acgactgcca 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 ctcaaccctt  | 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  | atttaattgg  | cacagttgat | gatgatggaa  | caatgagaat  | 4380 |
| aaaagatgac | gagactgaga  | acatcttaac  | agtgtcttta | aaaacagcac  | tactaatagt  | 4440 |
| atcaggcatc | tttccatact  | ccatacccg   | aacactgttg | gtctggcata  | cttggcaaaa  | 4500 |
| gcaaacccaa | agatccggcg  | tcctatggga  | cgtaccagc  | ccccagaga   | cacagaaagc  | 4560 |
| ggaactggaa | gaaggggtct  | ataggatcaa  | acagcaagga | atTTTTTggga | aaaccCaagt  | 4620 |
| gggggttgg  | 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  | tgactggat  | ttcaagcctg  | gaacttcagg  | 4920 |
| atctcccatc | ataaacagag  | agggaaaggt  | agtgggactg | tatggcaatg  | gagtggttac  | 4980 |
| aaagaatgga | ggctatgtca  | gtggaatagc  | gcaaacaat  | gcagaaccag  | atggaccgac  | 5040 |
| accagagtTg | gaagaagaga  | tgttcaaaaa  | gcgaaatcta | accataatgg  | atctccatcc  | 5100 |
| tgggtcagga | aagacgcgga  | aatatcttcc  | agctattgtt | agagaggcaa  | tcaagagacg  | 5160 |
| cttaaggact | ctaatttttg  | caccaacaag  | ggtagtTgca | gctgagatgg  | aagaagcatt  | 5220 |
| gaaagggctc | ccaataaggt  | atcaacaac   | tgcaacaaa  | tctgaacaca  | caggaagaga  | 5280 |
| gattgttgat | ctaattgtgtc | acgcaacgtt  | cacaatgcgc | ttgctgtcac  | cagtcagggt  | 5340 |
| tccaaactac | aacttgataa  | taatggatga  | ggccatttc  | acagaccag   | ccagtatagc  | 5400 |
| ggctagaggg | tacatatcaa  | ctcgtgtagg  | aatgggagag | gcagccgcaa  | ttttcatgac  | 5460 |
| agcaacaccc | cctggaacag  | ctgatgcctt  | tcctcagagc | aacgctcaa   | ttcaagatga  | 5520 |
| agagagagac | ataccggaac  | gctcatggaa  | ttcaggcaat | gaatggatta  | ctgactttgt  | 5580 |
| tgggaagaca | gtgtggtttg  | tccttagcat  | caaagccgga | aatgacatag  | caaactgctt  | 5640 |
| gcggaaaaat | ggaaaaaagg  | ttattcaact  | cagcaggaag | acctttgaca  | cagaatatca  | 5700 |
| aaagaccaaa | ctgaatgatt  | gggactttgt  | ggtgacaaca | gacatttcag  | aaatgggagc  | 5760 |
| caatttcaaa | gcagatagag  | tgatcgaccc  | aagaagatgt | ctcaagccgg  | tgattttgac  | 5820 |
| agatggaccc | gagcgggtga  | tcctggctgg  | accaatgcca | gtcaccgtag  | cgagcgctgc  | 5880 |
| gcaaaggaga | gggagagtTg  | gcaggaaccc  | acaaaaagaa | aatgaccagt  | acataattcat | 5940 |
| gggccagcct | ctcaacaatg  | atgaagacca  | tgctcactgg | acagaagcaa  | aatgctgct   | 6000 |
| ggacaacatc | aacacaccag  | aagggtattat | accagctctc | tttgaaccag  | aaaggagaa   | 6060 |
| gtcagccgcc | atagacggcg  | aataccgcct  | gaagggtgag | tccaggaaga  | ctttcgTgga  | 6120 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| actcatgagg aggggtgacc tcccagtttg gctagcccat aaagtagcat cagaagggat  | 6180 |
| caaatataca gatagaaaat ggtgctttga tggagaacgt aataatcaaa ttttagagga  | 6240 |
| gaatatggat gtggaaatct ggacaaagga aggagaaaag aaaaaactga gacctagggtg | 6300 |
| gcttgatgcc cgcacttatt cagatccttt agcactcaaa gaattcaagg attttgcagc  | 6360 |
| tggcagaaag tcaatcgccc ttgatcttgt gacagaaata ggaagagtgc cttcacactt  | 6420 |
| agcccacaga acgagaaacg ccctggataa tttggtgatg ctgcacacgt cagaacatgg  | 6480 |
| cggtagggcc tacaggcatg cagtggagga actaccagaa acgatggaaa cactcttact  | 6540 |
| cctgggactg atgatcttgt taacaggttg agcaatgctc ttcttgatat caggtaaagg  | 6600 |
| gattggaaag acttcaatag gactcatttg tgtaattgct tccagcggca tgttatggat  | 6660 |
| ggctgatgtc ccaactcaat ggatcgcatc ggctatagtc ctggagtttt ttatgatggt  | 6720 |
| gttgctcata ccagaaccag aaaagcagag aactcccaa gacaaccaac tcgcatatgt   | 6780 |
| cgtgataggc atacttacat tggctgcaat agtagcggcc aatgaaatgg gactgttga   | 6840 |
| aactacaaag agagatttag gaatgtctaa agaaccaggt gttgtttctc caaccagcta  | 6900 |
| tttggatgtg gacttgcacc cagcatcagc ctggacattg tacgccgtgg ccacaacagt  | 6960 |
| aataacacca atgttgagac acaccataga gaattccaca gcaaatgtgt ctctggcagc  | 7020 |
| catagctaac caggcagtgg tcctgatggg tttagacaaa ggatggccga tatcgaaaat  | 7080 |
| ggacttgggc gtaccactat tggcactggg ttgctattca caagtgaacc cactaactct  | 7140 |
| tgcagcggca gtacttttgc tagtcacaca ttatgcaatt ataggtccag gattgcaggc  | 7200 |
| aaaagccacc cgtgaagctc agaaaaggac agctgctgga ataatagaaga atccaacggt | 7260 |
| ggatggaata atgacaatag acctagatcc tgtaatatat gattcaaaat ttgaaaagca  | 7320 |
| actaggacag gtcatgctcc tggttctgtg tgcagtccaa cttttattga tgagaacatc  | 7380 |
| atgggccttg tgtgaagttc taaccctagc cacaggacca ataacaacac tctgggaagg  | 7440 |
| atcacctggg aagttctgga acaccacgat agctgtttcc atggcgaaca tcttttagagg | 7500 |
| gagctattta gcaggagctg ggcttgcttt ttctatcatg aaatcagttg gaacaggaaa  | 7560 |
| gagaggaaca gggtcacaag gtgaaacctt aggagaaaag tggaaaaaga aattaaatca  | 7620 |
| gttatcccg 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 agatgggtga accatggcta aagaacaacc agttttgcat  | 8100 |
| taaagtattg aaccataca tgccaactgt gattgagcac ttagaaaagac taaaaaggaa  | 8160 |

|                                                                    |       |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| acatggagga atgcttgtga gaaatccact ctcacgaaac tccacgcacg aaatgtattg  | 8220  |
| gatâtccaat ggtacaggca atatcgtctc ttcagtcaac atggtatcca gattgctact  | 8280  |
| gaacagattc acaatgacac acaggagacc caccatagag aaagatgtgg atctaggagc  | 8340  |
| aggâaccga catgtcaatg cggaaccaga aacacccaac atggatgtca ttggggaaag   | 8400  |
| aataaaaagg atcaaagagg agcatagttc aacatggcac tatgatgatg aaaatcctta  | 8460  |
| caaaacgtgg gcttaccatg gatcctatga agtaaaagcc acaggctcag cctcctccat  | 8520  |
| gataaatgga gtcgtgaaac tcctcacaaa accatgggat gtggtgcca tggtgacaca   | 8580  |
| gatggcaatg acagatacaa ctccattcgg ccagcaaaga gtttttaaag agaaagtgga  | 8640  |
| caccaggaca cctaggccca tgccaggaaac aagaaaggtt atggagatca cagcggagtg | 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  |
| aaaacttgga gagtttggtg aagcaaaagg cagtagggct atatggtaca tgtggttggg  | 9000  |
| agccaggtag cttgagttcg aggcgtcgg attcctcaat gaagaccact ggttctcgcg   | 9060  |
| tgaaaactct tacagtggag tagaaggaga aggactgcac aagctgggat acatcttgag  | 9120  |
| agatatttcc aagatacccg gaggagccat gtatgctgat gacacagccg gttgggacac  | 9180  |
| aagaataaca gaagatgacc tgcacaatga ggaaaaaatc acacagcaga tggaccctga  | 9240  |
| acacaggcag ctagcgaacg ctatattcaa gctcacatac caaaacaaag tggtaaagt   | 9300  |
| ccaacgacca actccaaagg gcacggtaat ggacatcata tctaggaaag accaaagagg  | 9360  |
| cagtggacag gtgggaactt atggtctgaa cacattcacc aacatggaag ccagctaata  | 9420  |
| cagacaaatg gaaggagaag gcgtgtgtgc aaaggcagac ctcgagaacc cccatccgct  | 9480  |
| agagaagaaa attacacaat ggttggaac taaaggagtg gaaaggttaa aaagaatggc   | 9540  |
| catcagcggg gatgattgcg ttgtgaaacc aatcgacgac agattcgcca atgccctgct  | 9600  |
| tgccctgaac gatatgggaa aggttagaaa ggacatacct caatggcagc catcaaaggg  | 9660  |
| atggcatgat tggcaacagg tccccttctg ctcccaccac tttcatgaat tgatcatgaa  | 9720  |
| agatggaaga aagttggtag ttccctgcag accccaggac gaactaatag gaagagcgag  | 9780  |
| aatctcccaa ggagcaggat ggagccttag agaaaactgca tgtctaggga aagcctacgc | 9840  |
| tcaaatgtgg gctctcatgt attttcacag aagagatctt agactagcat ccaacgccat  | 9900  |
| atgttcagca gtaccagtcc actgggtccc cagcagcaga acgacatggt ctattcatgc  | 9960  |
| tcaccatcag tggatgacta cagaagacat gcttactgtc tggaacaggg tgtggataga  | 10020 |
| ggacaatcca tggatggaag acaaaactcc agtcacaacg tgggaagatg ttccatatct  | 10080 |
| agggaagaga gaagaccaat ggtgcggatc actcataggt ctcacttcca 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 aagccacggg 10380
ttgagcaaac cgtgctgcct gtagctccgt cgtggggacg taaagcctgg gaggctgcaa 10440
accgtggaag ctgtacgcac ggtgtagcag actagtgggt agaggagacc cctcccatga 10500
cacaacgcag cagcggggcc cgagcactga ggaagctgt acctccttgc aaaggactag 10560
aggtagagag agaccccccg caaacaacaaa cagcatattg acgctgggag agaccagaga 10620
tcctgctgtc tcctcagcat cattccaggc acagaacgcc agaaaatgga atgggtgctgt 10680
tgaatcaaca ggttctagt 10699

```

```

<210> 44
<211> 10648
<212> DNA
<213> Vírus da Dengue

```

```

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

```

```

<400> 44
agttgttagt ctgtgtggac cgacaaggac agttccaaat cggaagcttg cttaacacag 60
ttctaacagt ttgtttgaat agagagcaga tctctgaaa aatgaaccaa cgaaaaaagg 120
tggttagacc acctttcaat atgctgaaac gcgagagaaa ccgcgtatca acccctcaag 180
ggttggtgaa gagattctca accggacttt tttctgggaa aggaccctta cggatggtgc 240
tagcattcat cacgtttttg cgagtccttt ccatcccacc aacagcaggg attctgaaaa 300
gatggggaca gttgaagaaa aataaggcca tcaggatact gattggattc aggaaggaga 360
taggccgcat gctgaacatc ttgaacggga gaaaaagggt aacgataaca ttgctgtgct 420
tgattccac cgtaatggcg ttctacttgt caacaagaga tggcgaaccc ctcatgatag 480
tggcaaaaca 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 atgggattgg 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 gtctcagggt gagcatgggt cgatctggtg ctagaacatg 1020
gaggatgcgt cacaacatg gcccgaggaa aaccaacctt ggattttgaa ctgactaaga 1080

```

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| caacagccaa ggaagtggct ctgttaagaa cctattgcat tgaagcctca atatcaaaca   | 1140 |
| taaecäcggc aacaagatgt ccaacgcaag gagagcctta tctaaaagag gaacaagacc   | 1200 |
| aacagtacat ctgccggaga gatgtggttag acagaggggtg gggcaatggc tgtggcttgt | 1260 |
| ttggaaaagg aggagtgtgtg acatgtgcga agttttcatg ttcggggaag ataacaggca  | 1320 |
| atttggtcca aattgagaac cttgaatata cagtggttgt aacagtccac aatggagaca   | 1380 |
| cccatgcagt aggaaatgac acatccaatc atggagttac agccacgata actcccaggt   | 1440 |
| caccatcggg ggaagtcaaa ttgccggact atggagaact aacactcgat tgtgaacca    | 1500 |
| ggctctggaat tgactttaat gagatgattc tgatgaaaat gaaaaagaaa acatggcttg  | 1560 |
| tgcataagca atgggtttttg gatctacctc taccatggac agcaggagca gacacatcag  | 1620 |
| aggttcactg gaattacaaa gagagaatgg tgacatttaa ggttcctcat gccaaagagac  | 1680 |
| aggatgtgac agtgctggga tctcaggaag gagccatgca ttctgccctc gctggagcca   | 1740 |
| cagaagtgga ctccggtgat ggaaatcaca tgtttgcagg acatctcaag tgcaaagtcc   | 1800 |
| gtatggagaa attgagaatc aagggaatgt catacacgat gtgttcagga aagttctcaa   | 1860 |
| ttgacaaaga gatggcagaa acacagcatg ggacaacagt ggtgaaagtc aagtatgaag   | 1920 |
| gtgctggagc tccgtgtaaa gtcccatag agataagaga tgtgaacaag aaaaaagtgg    | 1980 |
| ttgggcgtat catctcatcc acccctttgg ctgagaatac caacagtgca accaacatag   | 2040 |
| agttagaacc cccctttggg gacagctaca tagtgatagg tgttggaaac agtgcattaa   | 2100 |
| cactccattg gttcaggaaa gggagttcca ttggcaagat gtttgagtcc acatacagag   | 2160 |
| gtgcaaaacg aatggccatt ctaggtgaaa cagcttggga ttttggttcc gttggtggac   | 2220 |
| tgttcacatc attgggaaag gctgtgcacc aggtttttgg aagtgtgtat acaaccatgt   | 2280 |
| ttggaggagt ctcatggatg attagaatcc taattgggtt cctagtgttg tggattggca   | 2340 |
| cgaactcaag gaacacttca atggctatga cgtgcatagc tgttggagga atcactctgt   | 2400 |
| ttctgggctt cacagttcaa gcagacatgg gttgtgtggt gtcattggagt gggaaagaat  | 2460 |
| tgaagtgtgg aagcggaatt tttgtggttg acaacgtgca cacttggaca gaacagtaca   | 2520 |
| aatttcaacc ggagtcccca gcgagactag cgtctgcaat attgaatgcc cacaagatg    | 2580 |
| gggtctgtgg aattagatca accacgaggc tggaaaatgt catgtggaag caaataacca   | 2640 |
| acgagctaaa ttatgttctc tgggaaggag gacatgacct cactgtagtg gctggggatg   | 2700 |
| tgaagggggg gttgaccaa ggcaagagag cactcacacc cccagtgaat gatctgaaat    | 2760 |
| attcatggaa gacatgggga aaagcaaaaa tcttcacccc agaagcaaga aatagcacat   | 2820 |
| ttttaataga cggaccagac acctccgaat gcccgaatga acgaagagca tggaactttc   | 2880 |
| ttgagggtgga agactatgga tttggcatgt tcacgaccaa catatggatg aaattccgag  | 2940 |
| aaggaagttc agaagtgtgt gaccacaggt taatgtcagc ggcaattaaa gatcagaaa    | 3000 |
| ctgtgcatgc tgacatgggt tattggatag agagctcaaa aaaccagacc tggcagatag   | 3060 |
| agaaagcatc tcttattgaa gtgaaaacat gtctgtggcc caagaccac acattgtgga    | 3120 |

gcaatggagt gctggaaagc cagatgctca ttccaaaatc atatgcgggc cctttttcac 3180  
accacàatta ccgccagggc tatgccacgc aaaccgtggg cccatggcac ttaggcaaata 3240  
tagagataga ctttgagaga tgccccggaa caacagtcgc aattcaggag gattgtgacc 3300  
atagagggccc atctttgagg accaccactg catctggaaa actagtcacg caatggtgct 3360  
gccgctcctg cacgatgcct cccttaaggt tcttgggaga agatgggtgc tggatatggga 3420  
tgagagattag gcccttgagt gaaaaagaag agaacatggt caaatcacag gtaacggccg 3480  
gacagggcac atcagaaact ttttctatgg gtctgttgtg cctgacctg tttgtggaag 3540  
aatgcttgag gagaagagtc actaggaaac acatgatatt ggttgttgtg 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 cgggtgctttc aattccacat gaccttatgg 3840  
aactcattga tggaatatca ctggggctaa ttttgctaaa aatagtgaca ctttttgaca 3900  
acaccaagt gggaaacctta gccctttcct tgaccttcat aagatcaaca atgccattgg 3960  
tcatggcttg gaggaccatt atggctgtgt tgtttgttgt cacactcatt cttttgtgca 4020  
ggacaagctg tcttcaaaaa cagtctcatt gggtagaaat aacagcactc atcctaggag 4080  
cccaagctct gccagtgtac ctaatgactc ttatgaaagg agcctcaaga agatcttggc 4140  
ctcttaacga gggcataatg gctgtgggtt tggttagtct cttaggaagc gctcttttaa 4200  
agaatgatgt cccttttagct ggccaatgg tggcaggagg cttacttctg gcggcttacg 4260  
tgatgagtgg tagctcagca gatctgtcac tagagaaggc cgccaatgtg cagtgggatg 4320  
aaatggcaga cataacaggc tcaagcccaa tcatagaagt gaagcaggat gaagatggct 4380  
ctttctccat acgggacgtc gaggaacca atatgataac ctttttggtg aaactggcac 4440  
tgataacagt gtcagggtct tacccttgg caattccagt cacaatgacc ttatggtaca 4500  
tgtggcaagt gaaaacacaa agatcaggag ccctgtggga cgtccctca cccgctgcca 4560  
ctcaaaaagc cgcactgtct gaaggagtgt acaggatcat gcaaagaggg ttatttggga 4620  
aaactcaggt tggagtaggg atacacatgg aagggtgatt tcacacaatg tggcatgtaa 4680  
caagaggatc agtgatctgc catgagactg ggagattgga gccatcttgg gctgacgtca 4740  
ggaatgacat gatatcatac ggtgggggat ggagacttgg agacaaatgg gacaaagaag 4800  
aagatgttca ggtcctcgcc atagaaccag gaaaaaatcc taaacatgtc caaacgaaac 4860  
ccggcctttt caagacccta actggagaaa ttggagcagt aacattagat ttcaaaccg 4920  
gaacgtctgg ttctcccatc atcaacagga aaggaaaagt catcggaact 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 attttggtc ccacgagagt ggtggcggcc gagatggaag   | 5220 |
| aggccttacg tggactgcca atccgttatc agacccagc tgtgaaatca gaacacacag   | 5280 |
| gaagagagat tgtagacctc atgtgtcatg caaccttcac aacaagactt ttgtcatcaa  | 5340 |
| ccagagttcc aaattacaac ctcatagtga tggatgaagc acatttcacc gatccttcta  | 5400 |
| gtgtcgcggc tagaggatac atctcgacca ggggtggaaat gggagaggca gcagccatct | 5460 |
| tcatgaccgc aaccctccc ggagcgacag atccctttcc ccagagcaac agcccaatag   | 5520 |
| aagacatcga gagggaaatt ccggaaaggt catggaacac agggttcgac tggataacag  | 5580 |
| actaccaagg gaaaactgtg tggtttggtc ccagcataaa agctggaaat gacattgcaa  | 5640 |
| attgtttgag aaagtcggga aagaaagtta tccagttgag taggaaaacc tttgatacag  | 5700 |
| agtatccaaa aacgaaactc acggactggg attttggtgt cactacagac atatctgaaa  | 5760 |
| tgggggcca ttttagagct gggagagtga tagaccctag gagatgcctc aagccagtta   | 5820 |
| tcctaacaga tgggccagag agagtcattt tagcaggtcc tattccagtg actccagcaa  | 5880 |
| gcgctgtca gagaagaggg cgaataggaa ggaaccagc acaagaagac gaccaatacg    | 5940 |
| ttttctccgg agaccacta aaaaatgatg aagatcatgc ccactggaca gaagcaaaga   | 6000 |
| tgctgcttga caatatctac accccagaag ggatcattcc aacattgttt ggtccggaaa  | 6060 |
| gggaaaaaac ccaagccatt gatggagagt ttgcctcag aggggaacaa aggaagactt   | 6120 |
| ttgtggaatt aatgaggaga ggagacctc cgggtgtggc gagctataag gtagcttctg   | 6180 |
| ctggcatttc ttacaaagat cgggaatggt gcttcacagg ggaaaggaat aaccaaat    | 6240 |
| tagaagaaaa catggagggt gaaatttgga ctagagaggg agaaaagaaa aagctaaggc  | 6300 |
| caagatgggt agatgcacgt gtatacgctg accccatggc tttgaaggat ttaaggagt   | 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 ttcattgcaag | 6600 |
| ggaaaggaat agggaaattg tcaatgggtt tgataaccat tgcggtggct agtggcttgt  | 6660 |
| tctgggtagc agaaattcaa cccagtgga tagcggcctc aatcatacta gagttttttc   | 6720 |
| tcatggtact gttgataccg gaaccagaaa aacaaaggac cccacaagac aatcaattga  | 6780 |
| tctacgtcat attgaccatt ctaccatta ttggtctcat agcagccaac gagatggggc   | 6840 |
| tgattgaaaa aacaaaaacg gatTTTTGGGT ttaccaggT aaaaacagaa accaccatcc  | 6900 |
| tcgatgtgga cttgagacca gcttcagcat ggacgctcta tgcagtagcc accacawttc  | 6960 |
| tgactcccat gctgagacac accatagaaa acacgtcggc caacctatct ctagcagcca  | 7020 |
| ttgccaacca ggcggccgtc ctaatggggc ttggaaaagg atggccgctc cacagaatgg  | 7080 |
| acctcgggtg gccgctgtta gcaatgggat gctattctca agtgaaccca acaactttga  | 7140 |
| cagcatcctt agtcatgctt tcagtccatt atgcaataat aggtccagga ttgcaggcaa  | 7200 |

|            |             |            |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| aagccacaag | agaggccccag | 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 | acccctagga | 7560 |
| ggggaactgg | gaccacagga  | gagacactgg | gagagaagtg | gaagagacag | ctaaactcat | 7620 |
| takacagaaa | agagtttgaa  | gagtataaaa | gaagtggaat | actagaagtg | gacaggactg | 7680 |
| aagccaagtc | tgccctgaaa  | gatgggtcta | aaatcaagca | tgcagtatct | agagggtcca | 7740 |
| gtaagattag | atggattggt  | gagagagggg | tggtaaagcc | aaaagggaaa | gttgtagatc | 7800 |
| ttggctgtgg | gagaggagga  | tggtcttatt | acatggcgac | gctcaagaac | gtgactgaag | 7860 |
| tgaaagggtg | tacaaaagga  | ggtccaggac | atgaagaacc | gattcccatg | gctacttatg | 7920 |
| gctggaattt | ggtcaaaactc | cattcagggg | ttgacgtggt | ctacaaaccc | acagagcaag | 7980 |
| tggacaccct | gctctgtgat  | attggggagt | catcttctaa | tccaacaata | gaggaaggaa | 8040 |
| gaacattaag | agttttgaag  | atggtggagc | catggctctc | ttcaaacct  | gaattctgca | 8100 |
| tcaaagtcct | taacccttac  | atgccaacag | tcatagaaga | gctggagaaa | ctgcagagaa | 8160 |
| aacatggtgg | gaaccttgtc  | agatgcccgc | tgtccaggaa | ctccacccat | gagatgtatt | 8220 |
| gggtgtcagg | agcgtcggga  | aacattgtga | gctctgtgaa | cacaacatca | aagatgttgt | 8280 |
| tgaacagggt | 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 | aaccttggga | tgtggttcca | atggtgaccc | 8580 |
| agttagccat | gacagacaca  | accccttttg | ggcaacaaag | agtgttcaaa | gagaagggtg | 8640 |
| ataccagaac | accacaacca  | aaaccggta  | 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 | agagtttggc  | agagccaagg | gaagccgagc | aatctggtac | atgtggctgg | 9000 |
| gagcgcggtt | tctggaattt  | gaagccctgg | gttttttgaa | tgaagatcac | tggtttgga  | 9060 |
| gagaaaattc | atggagtgga  | gtggaagggg | aaggctctga | cagattggga | tatatcctgg | 9120 |
| aggagataga | caagaaggat  | ggagacctaa | tgtatgctga | tgacacagca | ggctgggaca | 9180 |
| caagaatcac | tgaggatgac  | cttcaaaatg | aagaactgat | cacggaacag | atggccccc  | 9240 |

|                                                                    |       |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| accacaagat cctagccaaa gccattttca aactaaccta tcaaaacaaa gtggtgaaag  | 9300  |
| tcctcagacc cacaccgaga ggagcgggta tggatatcat atccaggaaa gaccaaagag  | 9360  |
| gtagtggaca agttggaaca tatggtttga acacattcac caacatggaa gttcaactca  | 9420  |
| tctgccaat ggaagctgaa ggagtcata cacaagatga catgcagaac ccaaaagggt    | 9480  |
| tgaaagaaag agttgagaaa tggctgaaag agtgtggtgt cgacagggtta aagaggatgg | 9540  |
| caatcagtgg agacgattgc gtggtgaagc ccctggatga gaggtttggc acttccctcc  | 9600  |
| tcttcttgaa cgacatggga aaggtaggga aagacattcc gcagtgggaa ccatctaagg  | 9660  |
| gatggaaaaa ctggcaagag gttccttttt gctcccacca ctttcacaag atcttcatga  | 9720  |
| aggatggccg ctactagtt gttccatgta gaaaccagga tgaactgata gggagagcca   | 9780  |
| gaatctcgca gggggctgga tggagcttaa gagaaacagc ctgcctgggc aaagcttacg  | 9840  |
| cccagatgtg gtcgctcatg tacttccaca gaagggatct gcgtttagcc tccatggcca  | 9900  |
| tatgctcagc agttccaacg gaatggtttc caacaagcag aacaacatgg tcaatccacg  | 9960  |
| ctcatcatca gtggatgacc actgaagata tgctcaaagt gtggaacaga gtgtggatag  | 10020 |
| aagacaacc taatatgact gacaagactc cagtccattc gtgggaagat ataccttacc   | 10080 |
| tagggaaaag agaggatttg tgggtgtggat ccctgattgg actttcttcc agagccacct | 10140 |
| gggcgaagaa cattcacacg gccataacc aggtcagaaa cctgatcgga aaagaggaat   | 10200 |
| acgtggatta catgccagta atgaaaagat acagcgctcc ttcagagagt gaaggagttc  | 10260 |
| tgtaattacc aacaacaaac accaaaggct attgaagtca ggccacttgt gccacggctt  | 10320 |
| gagcaaaccg tgctgcctgt agctccgcca ataatgggag gcgtgaaatc cctagggagg  | 10380 |
| ccatgcgcca cggaagctgt acgcgtggca tattggacta gcggttagag gagaccctc   | 10440 |
| ccatcactga caaacgcag 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-1 VIVO ATENUADO, caracterizada pelo fato de que compreende a seqüência SEQ ID Nº 3, em que pelo menos os nucleotídeos nas posições 5962 e 7947 estão mutados, com a  
5 condição de que os seguintes nucleotídeos não estão mutados: 1323, 1541, 1543, 1545, 1567, 1608, 2363, 2695, 2782, 5063, 6048, 6806, 7330, e 9445.
2. CEPA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o nucleotídeo na posição 2719 também está mutado.
3. CEPA, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2,  
10 caracterizada pelo fato de que a SEQ ID Nº 3 compreende as mutações 2719 G>A, 5962 C>A, e 7947 A>G.
4. CEPA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que inclui também uma substituição de um ou mais nucleotídeos em uma determinada posição do códon que não resulta em  
15 alteração no aminoácido codificado naquela 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 da dengue-1 vivo atenuado, conforme  
20 definido em uma das reivindicações de 1 a 5, em um veículo farmacêuticamente aceitável.
7. COMPOSIÇÃO DE VACINA, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa do vírus da dengue-1 vivo atenuado, conforme definido em uma das reivindicações de 1 a 5, em um veículo farmacêuticamente  
25 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 para dengue multivalente.

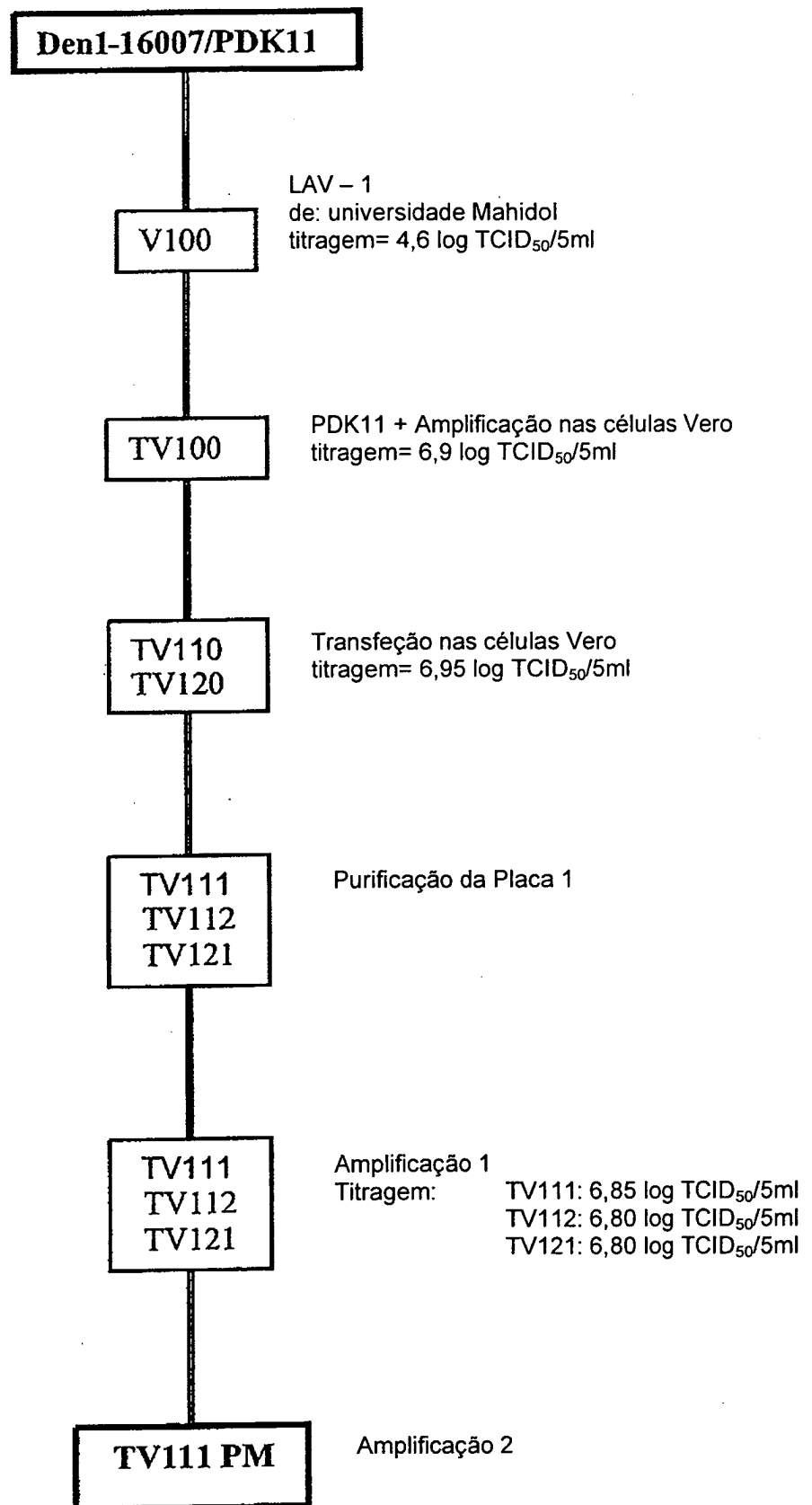
10. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que compreende um vírus da dengue-2 vivo  
5 atenuado que compreende a seqüência SEQ ID N° 40.

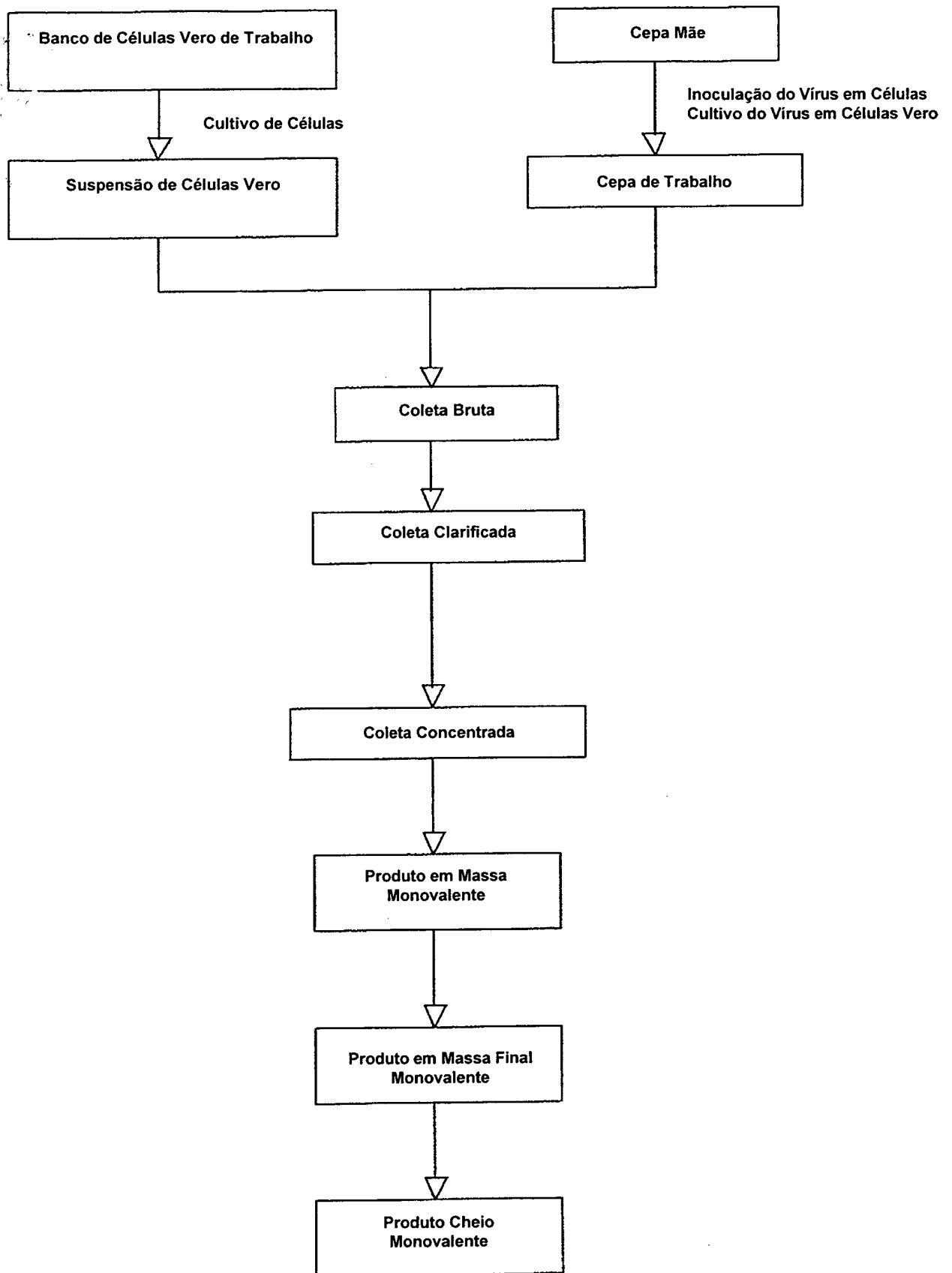
11. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 7 a 10, caracterizada pelo fato de que contém de  $10^3$  a  $10^6$  CCID<sub>50</sub> de cepa do vírus da dengue-1 vivo atenuado conforme definido em uma das reivindicações de 1 a 4.

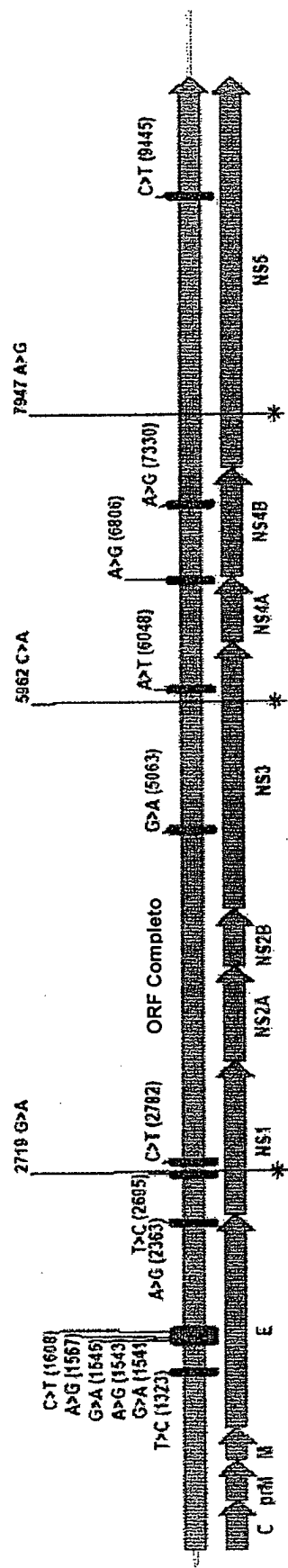
10 12. ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO, caracterizado pelo fato de que compreende a seqüência de DNA SEQ ID N° 1 ou sua seqüência de RNA equivalente.

13. POLIPROTEÍNA ISOLADA, caracterizada pelo fato de que é codificada pela SEQ ID N° 1 ou fragmentos desta, que compreende pelo  
15 menos uma lisina na posição 481 da proteína NS3, e/ou de uma arginina na posição 125 da proteína NS5.

14. FRAGMENTO DE POLIPROTEÍNA, conforme definida na reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende as proteínas NS3 e/ou NS5.

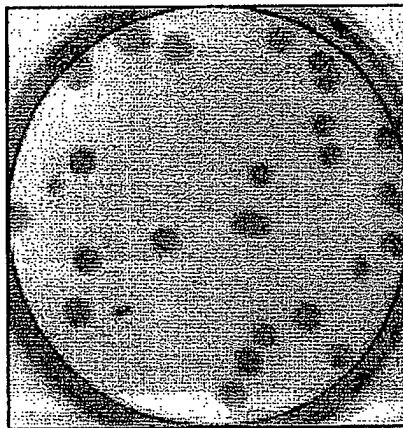
**Fig. 1**

**Fig. 2**

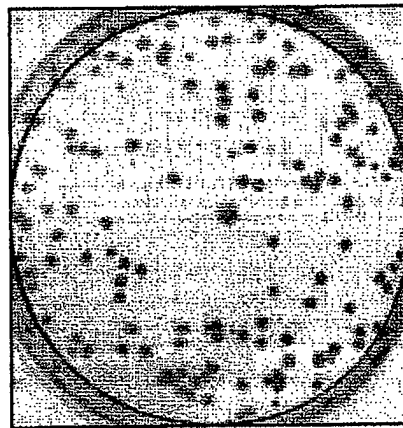


VDV1-03REC012  
10735 bp

Fig. 3

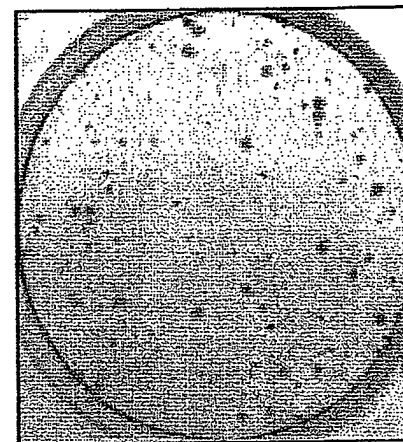


Cepa 16007 (Dia 7)



VDV 1 (Dia 7)

Fig. 4



LAV 1 (Dia 7)

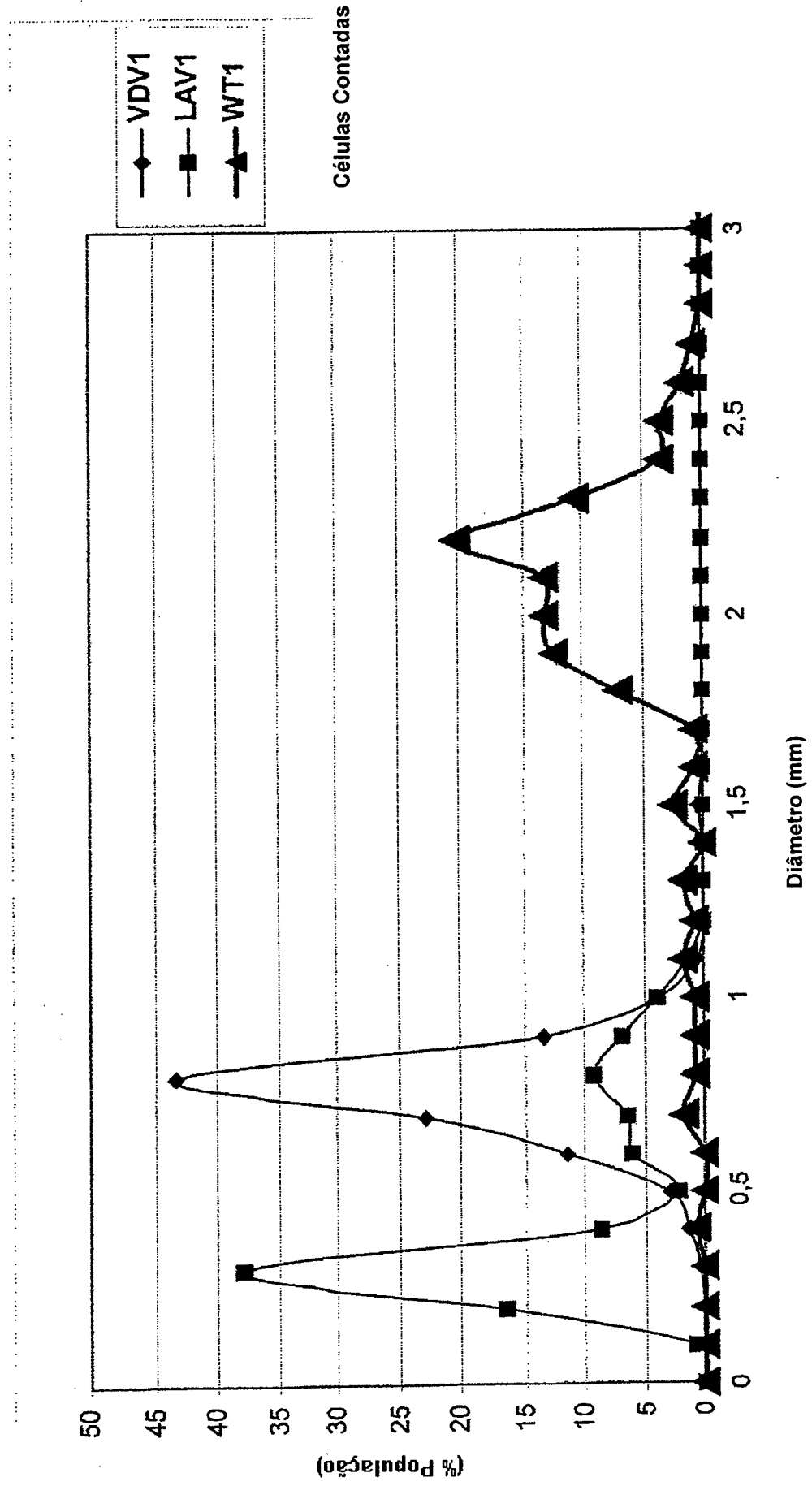
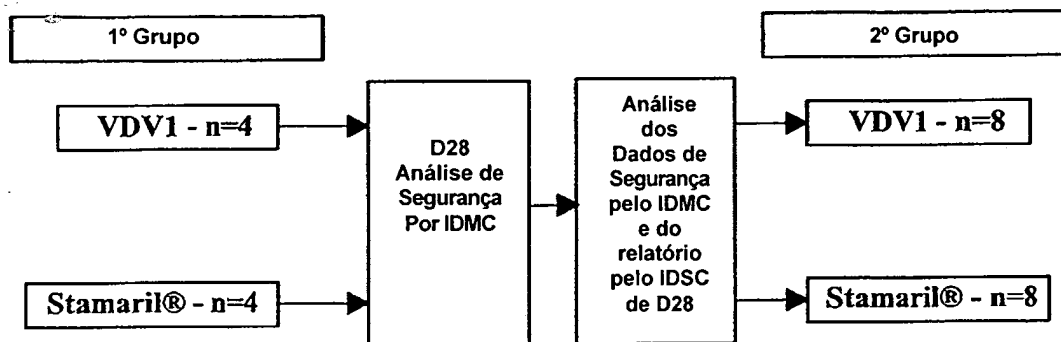


Fig. 5

**Fig. 6**

**RESUMO****CEPA DO VÍRUS DA DENGUE-1 VIVO ATENUADO, COMPOSIÇÃO  
IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO DE VACINA, ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO,  
POLIPROTEÍNA ISOLADA E FRAGMENTO DE POLIPROTEÍNA”**

5                   A presente invenção refere-se às cepas de vírus VDV1 vivos  
atenuados (vírus da dengue sorotipo-1 derivado de células VERO) que foram  
obtidas a partir de cepas 16007 do vírus da dengue-1 tipo selvagem pela  
passagem em células PDK e sanitização em células VERO. A presente  
invenção refere-se também a composição de uma vacina que inclui uma cepa  
10   do VDV1.