



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

(21) PI 0721141-4 A2



(22) Data de Depósito: 21/12/2007
(43) Data da Publicação: 01/04/2014
(RPI 2256)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/82
C07K 14/18
A01H 5/00

(54) Título: VACINAS DO VÍRUS WEST NILE (WNV)
PRODUZIDAS POR PLANTAS, VETORES E
SEQUÊNCIAS OTIMIZADAS DE CÓDONS DE
PLANTAS.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 US 60/871,518

(73) Titular(es): Dow Agrosience LLC, The United States Of
America As Represented By The Secretary Of Agriculture

(72) Inventor(es): Charles A. Mihaliak, Donald J. Merlo, Geoffrey
J. Letchworth, Kelley A. Smith, Steven L. Evans, Steven Robert Webb

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088512 de
21/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/143713 de
27/11/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VACINAS DO VÍRUS WEST NILE (WNV) PRODUZIDAS POR PLANTAS, VETORES E SEQUÊNCIAS OTIMIZADAS DE CÓDONS DE PLANTAS"**.

DESCRIÇÃO

5 REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos Estados Unidos Série Nº 60/871.518, depositado em 22 de dezembro de 2006, cuja descrição é por este incorporada por meio de referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras, tabelas e sequências de aminoácido ou ácido nucleico.

Esta invenção foi preparada com suporte governamental segundo USDA-ARS CRADA Acordo Nº 58-3K95-M-1040. O governo tem alguns direitos na invenção.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

15 O entendimento da neutralização do vírus West Nile (WNV) por anticorpos vem do estudo de WNV e seus parentes próximos o vírus da encefalite de Saint Louis, o vírus da encefalite de Murray Valley (MVEV), e o vírus da encefalite de Japonesa, bem como parentes mais distantes tais como o vírus da dengue, o vírus da febre amarela, e o vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (TBEV). Fortes similaridades na sequência das proteínas do envelope do flavivírus e a posição quase idêntica das cisteínas que formam ligações intramoleculares dentro das proteínas do envelope (Nowak *et al.*, 1987) sugerem que as proteínas do envelope de todos os flavivírus devem ter estruturas muito similares. Portanto, informações sobre
20 qualquer flavivírus geralmente é aplicável aos outros.

25 Heinz e Kunz (1982, 1977) mostraram que flavivírus contêm somente três proteínas, a proteína do envelope (E), a proteína de membrana (M), e a proteína do capsídeo (C). Recentes estudos estruturais do vírus da dengue (Kuhn *et al.*, 2002) confirmaram isto e mostraram a relação física
30 destas proteínas no vírion. Somente a proteína E é exposta sobre a superfície do vírion (Kuhn *et al.*, 2002). Até o momento, foram resolvidas as estruturas tridimensionais das proteínas E para WNV, TBEV, e dengue (Kuhn *et al.*,

2002; Mukhopadhyah *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 1995). Estas têm uma estrutura semelhante a dedo com três domínios claramente distintos, o domínio I estando no meio entre os domínios II e III. Moléculas individuais de proteína E se estendem lisas através da superfície do vírion com pares de moléculas
5 estendidos ao lado uns dos outros em orientação oposta e três pares estendidos lado a lado.

A proteína E de flavivírus é sintetizada como parte de uma poliproteína de extensão do genoma que inclui todas as proteínas virais. Em seguida é liberada da poliproteína por clivagem proteolítica. Clivagens precoces dentro da poliproteína liberam a proteína E ainda fixada a pré-membrana (pr) e proteínas M, a combinação das proteínas pr e M sendo conhecida como a proteína "prM". A proteína prM-E resultante é inserida na membrana do retículo endoplasmático onde começa a dobrar em sua conformação madura. O vírus é agrupado em compartimentos intracelulares
10 com a prM-E sobre a superfície. Clivagens subsequentes separam as proteínas E e prM e clivam a prM produzindo a proteína M madura. O fragmento pr não é incorporado em vírions. A proteína E pode ter ou não sequências de glicosilação e portanto pode ser ou não glicosilada (Hanna, *et al.*, 2005).

Flavivírus infectam células ligação à membrana celular, provavelmente através de uma interação entre a sequência RGD de proteína E domínio III e integrina da superfície celular (Lee *et al.*, 2000), e penetrando através do endossomas. Quando o endossoma acidifica, as proteínas do envelope do vírion sofrem alterações caras e irreversíveis em sua conformação intra- e intermolecular. As 180 moléculas de proteína E individuais de-
25 sassociam de seus dímeros, reorientam seus domínios e ligam para formar 60 picos triméricos que se projetam da membrana do vírion, inserem a ponta dos picos dentro da membrana endossômica, e agregam em 12 anéis pentaméricos de picos triméricos que fundem a membrana de vírions com a membrana endossômica, deste modo permitindo que o capsídeo penetre no
30 citoplasma da célula e inicie replicação (Bressanelli *et al.*, 2004). Está claro que a solubilização dos dímeros da superfície do vírion remove por ablação alguns epítomos relacionados com neutralização (Heinz *et al.*, 1991) mas não

está claro como a redistribuição e a trimerização altera sítios antigênicos de proteína E (Stiasny *et al.*, 1996).

Como somente a proteína E é exposta sobre a superfície do ví-
rion, anticorpos que ligam a e neutralizam vírions infecciosos intactos devem
5 ligar à proteína E. Isto foi comprovado mostrando o desenvolvimento de an-
ticorpos neutralizantes em animais imunizados com proteínas purificadas a
partir de vírus (Heinz *et al.*, 1990) e proteínas virais produzidos em sistemas
recombinantes (Bray *et al.*, 1989; Heinz *et al.*, 1986; Heinz *et al.*, 1982; Jan
et al., 1993; Konishi *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 1991; Men *et al.*, 1991; Pincus
10 *et al.*, 1992; Schlesinger *et al.*, 1992), e por experimentos de proteção passi-
va com anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína E (revisado em
Heinz *et al.*, 1977, 1986; Roehrig 1986).

Se esperaria que anticorpos que ligam algumas áreas sobre a
proteína E neutralizassem o vírus e anticorpos que ligam outras áreas não
15 podem. De modo a discriminar entre a atividade de neutralização de anticor-
pos que ligam a sequência de aminoácidos primária daqueles que ligam a
estrutura secundária e terciária da proteína E adequadamente dobrada,
Wengler e Wengler (1989) mostraram que a redução de ligações dissulfeto
para destruir a estrutura secundária e terciária da proteína removeu por a-
20 blação a capacidade da proteína E de WNV de produzir anticorpos neutrali-
zantes. Este experimento sugeriu fortemente que anticorpos neutralizantes
ligam à estrutura conformacional secundária e terciária da proteína E ao in-
vés da estrutura linear. Para confirmar isto, Roehrig *et al.* (1989) produziram
peptídeos a partir de epítomos previstos de proteína E de MVEV e descobri-
25 ram que somente um produziu anticorpos neutralizantes e somente em um
nível baixo. Na verdade, estudos subsequentes mostraram que anticorpos
monoclonais geralmente ligam ou proteína E nativa ou proteína E desnatu-
rada e seus peptídeos (Guirakhoo *et al.*, 1989; Holzmann *et al.*, 1993; Roe-
hrig *et al.*, 1989). Somente anticorpos que ligam a estrutura nativa neutrali-
30 zam o vírus.

Para mostrar exatamente quais áreas da proteína E são ataca-
das por anticorpos neutralizantes, mutações em vírus que escaparam de

neutralização por anticorpos monoclonais foram sequenciadas e mapeadas sobre a superfície da proteína E (revisado em Heinz *et al.*, 1983; Heinz *et al.*, 1990; Roehrig 1986). Estes dados permitiram a produção de modelos estruturais brutos (Cammack *et al.*, 1986; Kolaskar *et al.*, 1999; Mandl *et al.*, 1989; Roehrig *et al.*, 1989; Roehrig *et al.*; 1983) que foram subsequentemente refinados para mostrar que mutações mapeadas para todos os três domínios estruturais definidos por métodos cristalográficos de raios x (Cecilia *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 1992; Holzmann *et al.*, 1997; Holzmann *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994; Mandl *et al.*, 1989). Isto sugere fortemente que anticorpos podem neutralizar flavivírus por ligação a qualquer um dos três domínios. Não obstante, a maioria dos estudos se focalizaram sobre o domínio III onde ocorrem muitas mutações que escapam de anticorpos monoclonais neutralizantes (Beasley *et al.*, 2002). O domínio III também é o sítio de ligação para alguns anticorpos não-neutralizantes (Sanchez *et al.*, 2005). O domínio III pode ser isolado de vírions purificados como um fragmento resistente à tripsina (Winkler *et al.*, 1987) ou gerados como uma proteína recombinante (Mason *et al.* 1989) na sua reatividade com anticorpos monoclonais neutralizantes é dependente da manutenção de sua estrutura conformacional por sua única ligação dissulfeto. Vários anticorpos parecem neutralizar WNV por ligação a um peptídeo que é exposto sobre o domínio I somente durante a transição de fusão de membrana (Kanai *et al.*, 2006) ou um sítio que interfere com alterações estruturais no domínio III (Nybakken *et al.*, 2005).

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O presente pedido proporciona várias composições de substâncias dirigidas para polipeptídeos do vírus West Nile (WNV) e fragmentos dos mesmos e polinucleotídeos, vetores e células hospedeiras transformadas que codificam, dirigem a expressão de, ou produzem polipeptídeos de WNV conforme determinado aqui, neste pedido de patente. Métodos para usar os polipeptídeos e polinucleotídeos para a produção de reações imunes em indivíduos ou detectar a presença de WNV específica ou anticorpos neutralizantes também são proporcionados aqui, neste pedido de patente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 representa o plasmídeo pDAB2406 o qual contém o promotor do vírus do mosaico da veia da mandioca (CsVMV) descrito na publicação de patente internacional WO Nº 97/48819 e uma região não traduzida 3' de estrutura de leitura aberta, ORF23 3'UTR (GenBank número de acesso X00493) v1. Localizados entre o promotor CsVMV e ORF23 3'UTR v1 são sítios únicos, NcoI e SacI, os quais foram usados para inserir o gene de interesse.

A Figura 2 representa o vetor pDAB2418. pDAB2418 contém a região de fixação de matriz RB7 (MAR) (Patente dos Estados Unidos nº 5.773.689; Patente dos Estados Unidos nº 5.773.695; Patente dos Estados Unidos nº 6.239.328, publicação de patente internacional WO Nº 94/07902, e publicação de patente internacional WO Nº 97/27207) e a unidade de transcrição de planta onde o marcador de seleção vegetal fosfinotricin acetil transferase (PAT) (Patentes dos Estados Unidos Nos: 5.879.903; 5.637.489; 5.276.268; e 5.273.894) é dirigido pelo promotor AtUbi10 (Sun C.-W. *et al.*, 1997; Norris, S.R. *et al.*, 1993; Callis, J. *et al.*, 1995) e flanqueado, a jusante por AtuORF1 3' UTR v3 (Patente dos Estados Unidos nº 5.428.147; Barker, R.F., *et al.*, 1983; GenBank número de acesso X00493). Um único sítio NotI, localizado entre o gene RB7 MAR e o promotor vegetal AtUbi10, foi usado para clonar fragmentos genéticos de pDAB2406 contendo o promotor CsVMV, gene de interesse, e ORF23 3'UTR v1.

A Figura 3 ilustra um vetor binário básico modificado, pDAB2407. Este vetor binário foi construído adicionando um ligante Agel no único sítio BamHI de pBBV (Vetor Binário Básico) possibilitando ligação Agel/Agel do antígeno de WNV e cassetes de expressão de marcadores selecionáveis entre as bordas de T-DNA.

A Figura 4 é uma representação do vetor binário de dicot do Vírus West Nile pDAB2475 o qual codifica uma proteína quimérica consistindo em membrana e peptídeo do envelope do Vírus West Nile com propensão para códon de tabaco (versão 2) com ER tendo por alvo os sinais de retenção v2 e v3 KDEL (SEQ ID NO: 12).

A Figura 5 representa um vetor binário de dicot (pDAB2478) codificando uma proteína quimérica consistindo dos peptídeos v2 pré-membrana, de membrana e de envelope v2 do Vírus West Nile com propensão para códon de tabaco com ER tendo por alvo os sinais de retenção v2 e v3 KDEL (SEQ ID NO: 8).

A Figura 6 refere-se a um vetor binário de dicot, pDAB2481, codificando uma proteína quimérica consistindo dos peptídeos do Vírus West Nile com propensão para códon de tabaco pré-membrana v2, de membrana v2, e de envelope com um sítio de N-glicosilação mutado (versão 4) com ER tendo por alvo os sinais de retenção v2 e KDEL v3 (SEQ ID NO: 10).

As Figuras 7 a 11 representam um vetor de destinação, pDAB3736 (Figura 7), e quatro vetores doadores, pDAB3912 (Figura 8), pDAB3914 (Figura 9), pDAB3916 (Figura 10), e pDAB3724 (Figura 11) usados para contruir nove constructos binários com a tecnologia Gateway®.

A Figura 12 representa vetor binário da Gateway® WNV ME, pDAB3920. pDAB3920 codifica T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / WNV ME v2 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 13 ilustra vetor binário da Gateway®, pDAB3922. pDAB3922 contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / AtuMAS 4OCS promotor v4 / zeína de 15 kDa ER v2-WNV ME v2-KDELv3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 14 representa vetor binário do Vírus West Nile da Gateway™, pDAB3924. O vetor pDAB3924 contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / At Ubi10 promotor (Genbank Acesso nº L05363) v2 / zeína de 15 kDa ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 15 se refere a um vetor binário da Gateway®, pDAB3927 contendo os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / zeína de 15 kDa ER sinal v2-WNV ME v2 / Atu

ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 /
Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 16 proporciona vetor binário da Gateway®, pDAB3929.
pDAB3929 contém T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / Nt
5 osm 5' UTR v3 / zeína de 15 kDa ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 / Nt osm 3'
UTR v3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1
3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 17 é vetor binário da Gateway®, pDAB3934. Este vetor
contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / ORF25 / 26
10 3'UTR / KDELv3 / WNV ME v3 / zeína de 15 kDa ER sinal v2 (SEQ ID NO:
14) / AtuMAS 4OCS promotor v4 / zeína de 15 kD ER sinal v2- WNV ME v2-
KDELv3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1
3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 18 proporciona uma representação do vetor binário da
15 Gateway®, pDAB3941. pDAB3941 contém os seguintes componentes: T-
DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / zeína de 15 kD ER v2-
WNV ME v2-KDEL v3 / Atu ORF23 3'UTR v1 / AtUbi3 promotor v2 / zeína de
15 kD ER v2-WNV ME v3-KDELv3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promo-
tor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A.

A Figura 19 proporciona vetor binário da Gateway®, pDAB3943.
Este vetor contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 /
CsVMVv2 / WNV M v2 E com sítio de glicosilação modificado (v5) / Atu
ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 /
Múltiplo T-DNA Borda A.

25 A Figura 20 proporciona expressão de proteína E de eventos de
calo do Dia 14 transformados com pDAB2475 (dirigido para ER, ME Versão
2, KDEL), conforme detectado por ELISA.

A Figura 21 proporciona expressão de proteína E de eventos de
calo do Dia 14 transformados com pDAB2478 (dirigido para ER, prME Ver-
30 são 2, KDEL) conforme detectado por ELISA.

A Figura 22 proporciona expressão de proteína E de eventos de
calo do Dia 14 transformados com pDAB2481 (dirigido para ER, prME com

sítio de glicosilação modificado (Versão 4), KDEL) conforme detectado por ELISA.

A Figura 23 compara os níveis de expressão entre eventos transformados com pDAB2475, pDAB2478, e pDAB2481. Um potencial de
5 recuperação de proteína significativamente maior de pDAB2475 é indicado na figura.

A Figura 24 representa amostras de eventos selecionados que foram analisados por *Western blot* (calo do dia 14). De muitos dos eventos pDAB2475, proteína E de extensão total foi detectada no tamanho esperado
10 de ~54 kDa da proteína E de virion maduro autêntico.

As Figuras 25 e 26 ilustram que menos eventos expressando a proteína E de extensão total foram detectados com os constructos pDAB2478 e pDAB2481.

A Figura 27 compara Resultados de ELISA do Calo do Dia 14 de
15 Todos os Eventos de pDAB3920, pDAB3922, pDAB3924, pDAB3927, pDAB3929, pDAB3943, pDAB3934 e pDAB3941.

A Figura 28 representa amostras de calo do Dia 14 de eventos de pDAB3920 e pDAB3922 analisados por *Western blot*.

A Figura 29 representa amostras de calo do Dia 14 de eventos
20 de pDAB3924 e pDAB3927 analisados por *Western blot*.

A Figura 30 representa amostras de calo do Dia 14 de eventos de pDAB3929 e pDAB3934 analisados por *Western blot*.

A Figura 31 ilustra perfis de fermentação on-line para evento de WNV 1622-207 durante uma rodada de fermentação de STR de 10 litros (Lote ID WNV SRD05006). A redução na taxa de velocidade do agitador resultou na redução na captação de oxigênio próximo do término da fermentação.
25

A Figura 32 proporciona uma análise dos resíduos da fermentação para o lote ID WNV SRD05006.

A Figura 33 proporciona uma análise dos resíduos da fermentação para o lote ID WNV SRD05007.
30

A Figura 34 ilustra a cinética da produção de ME em células de suspensão de NT-1 de *N. tabacum* conforme determinado durante um período

do de 9 dias para Vírus West Nile recombinante eventos 1622-207 e 1622-210. É representada a produção de proteína do envelope de WNV durante uma fermentação de reator de tanque agitado de 218 horas (dia 9,08; subtrair a fase de 42 horas pré-inoculação do tempo do eixo x) de 10 litros. A produtividade volumétrica máxima de eventos de ME 1622-210 e 1622-207 ocorreu em 164 horas (206-42 horas), e 188 horas (230-42 horas) pós-inoculação respectivamente.

A Figura 35 proporciona uma representação gráfica de títulos séricos neutralizantes de WNV de um estudo de modelo clínico de camundongo (Estudo I). A figura foi gerada alterando títulos de neutralização de >2560 a 2560 e títulos de <20 a 20 e calculando o título médio geométrico de neutralização sérica (GMT) para cada grupo de tratamento.

A Figura 36 mostra a reação variável demonstrada por diferentes doses de antígeno e formulação com diferentes adjuvantes (Estudo II).

15 BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

A SEQ ID NO: 1 é uma sequência de DNA nativa de isolato flamingo de vírus do Nilo Ocidental "West Nile Virus" de GenBank Acesso nº AF196835, codificando prM-, M-, e E-peptídeos (Versão 1). A região codificante de peptídeo prM-M-E de WNV nativo tem 2004 bases de extensão e codifica o peptídeo prM (bases 1-276), o peptídeo M (bases 277-501) e o Peptídeo E (bases 502-2004).

A SEQ ID NO: 2 é uma sequência de aminoácidos de peptídeos prM, M, e E nativos codificada por SEQ ID NO: 1. O peptídeo prM é aminoácidos 1-92, o peptídeo M é aminoácidos 93-167 e o peptídeo E é aminoácidos 168-668.

A SEQ ID NO: 3 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco para peptídeos prM, M e E peptídeos (Versão 2). A SEQ ID NO: 3 tem 2004 bases de extensão e o peptídeo prM é codificado pelas bases 1-276, o peptídeo M é codificado pelas bases 277-501 e o peptídeos E é codificado pelas bases 502-2004.

A SEQ ID NO: 4 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco para peptídeos prM, M e E com sítio de N-glicosilação mutado (Versão 4). O

códon de prolina é nos nts 967-969 e a sequência tem 2004 bases de extensão. O peptídeo prM é codificado pelas bases 1-276, o peptídeo M é codificado pelas bases 277-501 e o peptídeo E é codificado pelas bases 502-2004.

5 A SEQ ID NO: 5 é uma sequência de aminoácidos de peptídeos prM, M, e E codificados por SEQ ID NO: 4 e contendo um sítio de N-glicosilação mutado. O resíduo prolina está na posição 323 e a sequência tem 668 aminoácidos de extensão. O peptídeo prM é aminoácidos 1-92, o peptídeo M é aminoácidos 93-167 e o peptídeo E é aminoácidos 168-668.

10 A SEQ ID NO: 6 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando peptídeos M e E (Versão 2). A sequência tem 1728 bases de extensão e o peptídeo M é codificado pelas bases 1-225. O peptídeo E é codificado pelas bases 226-1728.

15 A SEQ ID NO: 7 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando peptídeos M e E (Versão 3). Esta sequência tem 1728 bases de extensão e o peptídeo M é codificado pelas bases 1-225. O peptídeo E é codificado pelas bases 226-1728.

20 A SEQ ID NO: 8 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando proteína quimérica incluindo zeína de 15 kDa ER tendo por alvo peptídeo de sinal, peptídeos prM, M e E (Versão 2), e KDEL. A sequência tem 2106 bases de extensão e o sinal tendo por alvo ER de 15 kDa é codificado pelas bases 1-66. O peptídeo prM é codificado pelas bases 67-342, o peptídeo M é codificado pelas bases 343-567, o peptídeo E é codificado pelas bases 568-2070, o sinal de retenção do ER KDEL é codificado pelas bases 2071-2082 e seis paradas de estrutura estão localizadas nas bases 2083-2106.

25 A SEQ ID NO: 9 é uma sequência de aminoácidos da proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 8. A proteína de fusão tem 694 aminoácidos de extensão e contém um peptídeo tendo por alvo ER zeína de 15 kDa (aminoácidos 1-22), o peptídeo prM (aminoácidos 23-114), o peptídeo M (aminoácidos 115-189), o peptídeo E (aminoácidos 190-690), um sítio de N-glicosilação (aminoácidos 343-345) e o sinal de retenção do ER

30

KDEL (aminoácidos 691-694).

A SEQ ID NO: 10 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando proteína quimérica incluindo peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, peptídeos prM, M e E com sítio de N-glicosilação mutado (Versão 4) e KDEL. A sequência tem 2106 bases de extensão e o sinal tendo por alvo ER de 15 kDa é codificado pelas bases 1-66, o peptídeo prM é codificado pelas bases 67-342, o peptídeo M é codificado pelas bases 343-567, o peptídeo E é codificado pelas bases 568-2070, o sinal de retenção do ER KDEL é codificado pelas bases 2071-2082 e seis paradas de estrutura estão localizadas nas bases 2083-2106.

A SEQ ID NO: 11 é uma sequência de aminoácidos da proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 10. O polipeptídeo tem 694 aminoácidos de extensão e o peptídeo tendo por alvo ER zeína de 15 kDa está localizado nos aminoácidos 1-22. O peptídeo prM é encontrado nos aminoácidos 23-114, o peptídeo M é encontrado nos aminoácidos 115-189, o peptídeo E é encontrado nos aminoácidos 190-690 e sítio de N-glicosilação mutado é nos aminoácidos 343-345 e o sinal de retenção do ER KDEL é aminoácidos 691-694.

A SEQ ID NO: 12 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando proteína quimérica incluindo peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, peptídeos M e E (Versão 2) e KDEL. A sequência tem 1830 bases de extensão e o sinal tendo por alvo ER de 15 kDa é codificado pelas bases 1-66, o peptídeo M é codificado pelas bases 67-291, o peptídeo E é codificado pelas bases 292-1794, o sinal de retenção do ER KDEL é codificado pelas bases 1795-1806 e as seis paradas de estrutura compreendem as bases 1807-1830.

A SEQ ID NO: 13 é uma sequência de aminoácidos da proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 12. Esta sequência tem 602 aminoácidos de extensão e o peptídeo tendo por alvo ER zeína de 15 kDa é aminoácidos 1-22. O peptídeo M está localizado nos aminoácidos 23-97, o peptídeo E está localizado nos aminoácidos 98-598 e o sinal de retenção do ER KDEL é encontrado nos aminoácidos 599-602.

A SEQ ID NO: 14 é uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando proteína quimérica incluindo peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, peptídeos M e E (Versão 3) e KDEL. Esta sequência tem 1832 bases de extensão, o sinal tendo por alvo ER de 15 kDa é codificado pelas bases 6-68, o peptídeo M é codificado pelas bases 69-293, o peptídeo E é codificado pelas bases 294-1796, o sinal de retenção do ER KDEL é codificado pelas bases 1797-1808 e seis paradas de estrutura compreendem as bases 1809-1832.

A SEQ ID NO: 15 é uma sequência de aminoácidos da proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 14. A sequência tem 601 aminoácidos de extensão e o peptídeo tendo por alvo ER zeína de 15 kDa é aminoácidos 1-21. O peptídeo M está localizado nos aminoácidos 22-96, o peptídeo E está localizado nos aminoácidos 97-597 e o sinal de retenção do ER KDEL é encontrado nos aminoácidos 598-601.

15 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O presente pedido proporciona as seguintes composições de substâncias não-limitantes bem como métodos para usar estas composições de substâncias na produção de polipeptídeos imunogênicos e métodos para induzir reações imunes em indivíduos. Portanto, a presente invenção proporciona várias composições de substâncias compreendendo:

a) polipeptídeos isolados, purificados, e/ou recombinantes compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15;

b) um fragmento do polipeptídeo determinado em SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15 ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 que é "de Y a Z", em que Y é o aminoácido N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido C-terminal da sequência especificada. Portanto, para SEQ ID NO: 5, cada fragmento pode ter entre 5 aminoácidos consecutivos e 667 aminoácidos consecutivos de extensão. Cada fragmento contendo entre 5 e 693 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 9 e 11 são especificamente contemplados pela presente invenção. Igualmente, para SEQ ID NO: 13, cada fragmento de polipeptídeo entre 5 e 601 aminoácidos consecutivos é especificamente contemplado pela presente invenção. Adicionalmente, cada

fragmento de polipeptídeo abarcando entre 5 e 600 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 15 também é especificamente contemplado pela presente invenção. Fragmentos "de Y a Z", em que Y é o aminoácido N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido C-terminal de uma sequência especificada também proporcionada na Tabela 9 para SEQ ID NO: 5, Tabela 10 para SEQ ID NOs: 9 e 11, Tabela 11 para SEQ ID NO: 13 e Tabela 12 para SEQ ID NO: 15. Fragmentos de polipeptídeos conforme determinado neste pedido têm no mínimo uma atividade biológica que é substancialmente a mesma que a atividade biológica correspondente do polipeptídeo de extensão total de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15. Vários outros fragmentos de polipeptídeos exemplares são determinados nas Tabelas 15 ou 16;

c) um peptídeo E conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo;

d) um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades a), b) ou c) que compreende adicionalmente uma sequência de polipeptídeo heteróloga;

e) um polipeptídeo derivado de planta de acordo com qualquer uma das modalidades a), b), c) ou d);

f) uma composição compreendendo um veículo e um polipeptídeo conforme determinado em qualquer uma de a), b), c), d) ou e), em que o referido veículo é material celular do sistema de expressão em planta, mamífero ou bacteriano (opcionalmente suspenso em um tampão), um adjuvante ou um excipiente farmacologicamente aceitável;

g) uma sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou codificando um ou mais fragmentos de polipeptídeo de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 conforme determinado em (b) ou (c), opcionalmente em que a referida sequência de polinucleotídeos tem um teor de G+C de no mínimo 40% e menos de 50% ou um teor de G+C conforme determinado na Tabela 13;

- h) uma sequência de polinucleotídeos que é no mínimo 70% (ou uma percentagem conforme especificado na Tabela 14) idêntica à SEQ ID NO: 1, codifica um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 2 e tem um teor de G+C dentre cerca de 40% e cerca de 50% (ou um teor de G+C específico conforme especificado na Tabela 13);
- i) uma sequência de polinucleotídeos no mínimo 8 nucleotídeos consecutivos de uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (g) ou (h);
- j) uma sequência de polinucleotídeos compreendendo SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, ou 14 ou um fragmento de no mínimo 8 nucleotídeos consecutivos de SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, ou 14;
- k) um polinucleotídeo que é complementar aos polinucleotídeos determinados em (g), (h), (i), ou (j);
- l) um polinucleotídeo que hibridiza sob baixa, intermediária ou elevada stringência com uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (g), (h), (i), (i) ou (k);
- m) um constructo genético compreendendo uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (g), (h), (i), (i) ou (k);
- n) um vetor compreendendo um polinucleotídeo ou constructo genético conforme determinado em (g), (h), (i), (i), (j), (k) ou (l);
- o) uma célula hospedeira compreendendo um vetor conforme determinado em (n), um constructo genético conforme determinado em (m), ou um polinucleotídeo conforme determinado em qualquer uma de (g), (h), (i), (j) ou (k);
- p) uma planta transgênica, célula de planta, ou parte de planta compreendendo um vetor conforme determinado em (n), um constructo genético conforme determinado em (m) ou um polinucleotídeo conforme determinado em qualquer um de (g), (h), (i), (j) ou (k); ou
- q) uma sonda compreendendo um polinucleotídeo de acordo com (g), (h), (i), (j), (k) ou (l) e, opcionalmente, uma etiqueta ou marcador.

No contexto da presente invenção, os termos "oligopeptídeo", "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" podem ser usados de modo intercam-

biável; no entanto, deve ser entendido que a invenção não se refere ao polipeptídeos em forma natural, isto é, não estão em seu ambiente natural mas que os polipeptídeos podem ter sido isolados ou obtidos por purificação a partir de fontes naturais ou obtidos de células hospedeiras preparadas por manipulação genética (por exemplo, os polipeptídeos, ou fragmentos dos mesmos, são produzidos de modo recombinante por células hospedeiras, ou por síntese química). Polipeptídeos de acordo com a presente invenção também podem conter aminoácidos não-naturais, conforme será descrito abaixo. Os termos "oligopeptídeo", "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" também são usados, na presente especificação, para designar uma série de resíduos, tipicamente L-aminoácidos, conectados uns aos outros, tipicamente por ligações de peptídeos entre os grupamentos α -amino e carboxila de aminoácidos adjacentes. Elementos ligantes podem ser unidos aos polipeptídeos da presente invenção através de ligações de peptídeos ou através de ligações químicas (por exemplo, elementos ligantes químicos heterobifuncionais) conforme determinado abaixo. Adicionalmente, os termos "aminoácido(s)" e "resíduo(s)" podem ser usados de modo intercambiável.

No contexto tanto de polipeptídeos quanto de polinucleotídeos, o termo "sucessivo" pode ser usado de modo intercambiável com o termo "consecutivo" ou a expressão "trecho contíguo" ("*span* contíguo") do início ao fim do presente pedido. Portanto, em algumas modalidades, um fragmento de polinucleotídeo pode ser referido como "um trecho contíguo de no mínimo X nucleotídeos, em que X é qualquer valor inteiro iniciando com 5; o limite superior para fragmentos conforme determinado aqui, neste pedido de patente, é um nucleotídeo menos do que o número total de nucleotídeos encontrado na sequência de extensão total codificando um polipeptídeo em particular (por exemplo, um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 9). Um fragmento de polipeptídeo, por exemplo, pode ser referido como "um trecho contíguo de no mínimo X aminoácidos, em que X é qualquer valor inteiro iniciando com 5; o limite superior para os fragmentos de polipeptídeo referidos é um aminoácido menos do que o número total de aminoácidos encontrado na sequência de extensão total de um polipeptídeo em particular

(por exemplo, 667 para SEQ ID NO: 5, 693 para SEQ ID NO: 9 e 11, 601 aminoácidos para SEQ ID NO: 13 e 600 aminoácidos para SEQ ID NO: 15). Conforme usado aqui, neste pedido de patente, o termo "inteiro" se refere a números inteiros no sentido matemático.

5 "Sequência de nucleotídeo", "polinucleotídeo" ou "ácido nucleico" pode ser usado de modo intercambiável e são entendidos como indicando, de acordo com a presente invenção, ou um DNA de filamento duplo, um DNA de filamento único ou produtos da transcrição dos DNAs referidos (por exemplo, moléculas de RNA). Também deve ser entendido que a presente
10 invenção não se refere a sequências de polinucleotídeos genômicas em seu ambiente natural ou estado natural. As sequências de ácido nucleico, polinucleotídeo, ou nucleotídeos da invenção podem ser isoladas, purificadas (ou parcialmente purificadas), por métodos de separação incluindo, mas não limitados à, cromatografia de permuta iônica, cromatografia de exclusão de
15 tamanho molecular, ou por métodos de engenharia genética tais como amplificação, hibridização subtrativa, clonagem, subclonagem ou síntese química, ou combinações destes métodos de engenharia genética. Os termos "vacina de polinucleotídeo" e "vacina de DNA" também pode ser usado de modo intercambiável aqui, neste pedido de patente.

20 Os termos "compreendendo", "consistindo em" e "consistindo essencialmente de" são definidos de acordo com seu significado de via. Os termos podem ser substituídos uns pelos outros do início ao fim do presente pedido de modo a agregar o significado específico associado com cada termo. As expressões "isolado" ou "biologicamente puro" se referem a material
25 que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes os quais normalmente acompanham o material conforme é encontrado em seu estado nativo. Portanto, peptídeos isolados de acordo com a invenção preferencialmente não contêm materiais normalmente associados com os peptídeos em seu ambiente *in situ*. "Encadear" ou "unir" se refere a quaisquer métodos
30 conhecidos na técnica para conectar funcionalmente peptídeos, incluindo, sem limitação, fusão recombinante, ligação covalente, ligação dissulfeto, ligação iônica, ligação de hidrogênio, e ligação eletrostática.

Portanto, a presente invenção proporciona polipeptídeos compreendendo SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 e/ou fragmentos de polipeptídeo de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15. Fragmentos de polipeptídeos, de acordo com a presente invenção, compreendem um trecho contíguo de no mínimo 5 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15. Fragmentos de polipeptídeos de acordo com a presente invenção pode ser qualquer número inteiro de extensão de no mínimo 5 aminoácidos consecutivos a 1 aminoácido menos do que um polipeptídeo de extensão total de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15. Fragmentos de SEQ ID NO: 5 podem conter qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 667. Para SEQ ID NO: 9 ou 11 um fragmento de polipeptídeo é qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 693. Para SEQ ID NO: 13, um fragmento de polipeptídeo é qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 601. Para SEQ ID NO: 15, um fragmento de polipeptídeo é qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo 5 e 600 aminoácidos.

Cada fragmento de polipeptídeo da presente invenção também pode ser descrito em termos de suas posições N-terminal e C-terminal. Adicionalmente, modalidades de fragmentos de polipeptídeos descritos aqui, neste pedido de patente, podem ser "no mínimo", "igual a", "igual a ou menos de", "menos de", "no mínimo ___ mas não mais de ___" ou "de Y a Z", em que Y é o aminoácido N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido C-terminal da sequência especificada, o fragmento tem no mínimo 5 aminoácidos de extensão, e Y e Z são qualquer número inteiro especificado (ou selecionado entre) os inteiros identificados nas tabelas especificando as extensões de fragmentos correspondentes para cada polipeptídeo revelado aqui, neste pedido de patente, (vide as Tabelas 9, 10, 11, 12, 15, e 16 [as posições listadas nas tabelas correspondem à posição de aminoácido conforme proporcionado na listagem de sequência anexada]). Conforme é evidente na Tabela 10, o aminoácido N-terminal para os fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11 pode ser qualquer número inteiro de 1 a 690 e o aminoácido C-terminal é qualquer número inteiro de 5 a 694 (dependendo da extensão do

fragmento a qual deve ser qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 694). Para fragmentos de SEQ ID NO: 5 (mostrada na Tabela 9), o aminoácido N-terminal pode ser qualquer número inteiro entre 1 e 664 e o aminoácido C-terminal é qualquer número inteiro de 5 a 667 (dependendo da extensão do fragmento a qual deve ser qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 667). Com respeito a fragmentos de SEQ ID NO: 13 (ilustrada na Tabela 11), o aminoácido N-terminal pode ser qualquer número inteiro entre 1 e 598 e o aminoácido C-terminal é qualquer número inteiro de 5 a 602 (dependendo da extensão do fragmento a qual é qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 601 aminoácidos). Para SEQ ID NO: 15 (proporcionada na Tabela 12), o aminoácido N-terminal pode ser qualquer número inteiro entre 1 e 597 e o aminoácido C-terminal é qualquer número inteiro de 5 a 601 (dependendo da extensão do fragmento a qual é qualquer número (inteiro) de aminoácidos consecutivos entre, e incluindo, 5 e 600 aminoácidos). Observa-se que todas as faixas usadas para descrever qualquer modalidade da presente invenção são inclusivas a menos que especificamente determinado de modo diverso e que fragmentos de um dado polipeptídeo pode ser qualquer número inteiro de extensão, contanto que a extensão do fragmento de polipeptídeo seja no mínimo um aminoácido mais curto do que o polipeptídeo identificado na SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15. Para ilustrar este conceito, são proporcionados os quatro fragmentos proporcionados pela Tabela 12 que têm 598 aminoácidos de extensão. Portanto, os vários fragmentos de polipeptídeo são definidos como: onde Y é posição 1 de SEQ ID NO: 15, Z é posição 598 de SEQ ID NO: 15 (o peptídeo tem 598 aminoácidos de extensão); onde Y é posição 2 de SEQ ID NO: 15, Z é posição 599 de SEQ ID NO: 15 (o peptídeo tem 598 aminoácidos de extensão); onde Y é posição 3 de SEQ ID NO: 15, Z é posição 600 de SEQ ID NO: 15 (o peptídeo tem 598 aminoácidos de extensão); e onde Y é posição 4 de SEQ ID NO: 15, Z é posição 601 de SEQ ID NO: 15 (o peptídeo tem 598 aminoácidos de extensão).

A presente invenção também proporciona vários fragmentos de

polipeptídeo (compreendendo trechos contíguos ou trechos consecutivos de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos) que abarcam resíduos particulares de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15. Para SEQ ID NOs: 9 e 11, fragmentos preferenciais incluem os de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos que

5 incluem no mínimo um dos aminoácidos nas posições 1-22 [*isto é*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou todos os 22 dos aminoácidos], no mínimo um, dois ou todos os três dos aminoácidos nas posições 343-345 de SEQ ID NOs: 9 ou 11, e no mínimo um, dois, três ou todos os quatro dos aminoácidos 691 a 694 conforme determinado em SEQ

10 ID NO: 9 ou 11. Exemplos não-limitantes ilustrando algumas destas combinações de aminoácidos são determinados na Tabela 15 ou 16. Para SEQ ID NO: 5, algumas modalidades proporcionam quaisquer dos fragmentos de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos que abarcam o aminoácido 323. Para SEQ ID NO: 13, várias modalidades da invenção proporcionam frag-

15 mentos de polipeptídeo de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos que abarcam ou incluem: no mínimo um dos aminoácidos nas posições 1-22 de SEQ ID NO: 13; e/ou no mínimo um, dois, três, ou todos os quatro dos aminoácidos nas posições 599-602 de SEQ ID NO: 13. Referindo-se à SEQ ID NO: 15, fragmentos de polipeptídeo exemplares incluem os que abarcam, ou

20 incluem no mínimo um dos aminoácidos nas posições 1-21 e/ou 598-601 de SEQ ID NO: 15. Fragmentos de polipeptídeos adicionais também são determinados nas Tabelas 15 e 16. Em alguns aspectos da invenção, fragmentos de polipeptídeo preferenciais são a sequência de peptídeo E completa identificada nas SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15.

25 Fragmentos, conforme descrito aqui, neste pedido de patente, podem ser obtidos clivando os polipeptídeos da invenção com uma enzima proteolítica (tal como tripsina, quimotripsina, ou collagenase) ou com um reagente químico, tal como brometo de cianogênio (CNBr). Alternativamente, fragmentos de polipeptídeo podem ser gerados em um ambiente altamente

30 acidífero, por exemplo, em pH 2,5. Os fragmentos de polipeptídeo refridos podem ser igualmente bem preparados por síntese química ou usando hospedeiros transformados com um vetor de expressão de acordo com a inven-

ção. As células hospedeiras transformadas contêm um ácido nucleico, permitindo a expressão destes fragmentos, sob o controle de elementos apropriados para regulação e/ou expressão do fragmentos de polipeptídeo.

Em algumas modalidades preferenciais, fragmentos dos polipeptídeos revelados aqui, neste pedido de patente, retêm no mínimo uma propriedade biológica ou atividade biológica do polipeptídeo de extensão total do qual os fragmentos são derivados (os fragmentos referidos também podem ser referidos como "fragmentos biologicamente ativos". Portanto, tanto os polipeptídeos de extensão total quanto os fragmentos dos polipeptídeos proporcionados por SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 têm uma ou mais das seguintes propriedades ou atividades biológicas: a capacidade de: 1) ligar especificamente a anticorpos específicos para SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; 2) ligar especificamente anticorpos encontrados em um animal ou humano infectado com vírus West Nile e/ou anticorpos que neutralizam vírus infeccioso West Nile (a capacidade do vírus infectar um hospedeiro ou célula-alvo); a capacidade para ligar a, e ativar receptores de células T (CTL (linfócito T citotóxico) e/ou HTL (receptores de linfócitos T auxiliares)) no contexto de antígeno MHC Classe I ou Classe II que são isolados ou derivados de um animal ou humano infectado com vírus West Nile; 3) a capacidade para induzir uma reação imune em um animal ou humano contra um vírus West Nile; 4) a capacidade para induzir uma reação imune protetora em um animal ou humano contra um vírus West Nile; e/ou 5) a capacidade para induzir a produção de anticorpos neutralizantes de vírus West Nile (também referidos como anticorpos neutralizantes) em um animal / indivíduo imunizado com um ou mais dos referidos polipeptídeos.

Onde sistemas de expressão vegetal são usados para a produção de polipeptídeos proporcionados no presente pedido, ou fragmentos dos mesmos, uma composição compreendendo o polipeptídeo purificado pode incluir componentes de células de planta (por exemplo, paredes celulares, a matriz celular de membranas de células de planta e carboidratos, e etc.) ou componentes da matriz de células de planta. Igualmente, onde sistemas de expressão eucarióticos ou procarióticos são usados para a produção de po-

lipeptídeos da presente invenção, ou fragmentos dos mesmos, membrana celular ou componentes da parede celular de cada sistema de expressão respectivo pode estar presente em uma composição compreendendo polipeptídeos parcialmente purificados.

5 Os polipeptídeos (ou fragmentos dos mesmos) da invenção podem ser monoméricos ou multiméricos (por exemplo, dímeros, trímeros, tetrameros e multímeros maiores). Por conseguinte, a presente invenção se refere a monômeros e multímeros dos polipeptídeos da invenção, sua preparação, e composições contendo os mesmos. Polipeptídeos multiméricos, conforme determinado aqui, neste pedido de patente, podem ser formadas
10 associações hidrofóbicas, hidrofílicas, iônicas e/ou covalentes e/ou podem ser encadeadas indiretamente, por, por exemplo, formação de lipossoma. Portanto, em uma modalidade, multímeros da invenção, tais como, por exemplo, homodímeros ou homotrímeros, são formados quando polipeptídeos da invenção contactam um ao outro em solução. Em outra modalidade, heteromultímeros da invenção, tais como, por exemplo, heterotrímeros ou heterotetrameros, são formados quando polipeptídeos da invenção contactam anticorpos com os polipeptídeos da invenção (incluindo anticorpos para a sequência de polipeptídeo heteróloga em uma proteína de fusão da invenção) em solução. Em outras modalidades, multímeros da invenção são formados por associações covalente com e/ou entre os polipeptídeos da invenção. Um exemplo não-limitante de uma associação covalente semelhante é a formação de ligações dissulfeto entre cadeias pesadas de imunoglobulina conforme proporcionado por uma proteína de fusão da invenção que compreende um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 (ou fragmentos dos mesmos) fundido a uma cadeia pesada de Ig (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 5.478.925, cuja descrição é por este incorporada por meio de referência em sua totalidade). Outro exemplo de uma proteína de fusão capaz de formar multímeros associados de modo covalente é oseteoprotegerina (vide, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional WO Nº 98/49305, aqui, a este pedido de patente, incorporada por meio de referência em sua totalidade). Em outra modalidade, dois ou
30

mais polipeptídeos da invenção são unidos através de ligantes de peptídeos. Exemplos incluem os ligantes de peptídeos descritos na Patente dos Estados Unidos nº 5.073.627 (por este incorporada por meio de referência). Proteínas compreendendo múltiplos polipeptídeos da invenção separados por
5 ligantes de peptídeos podem ser produzidas usando tecnologia de DNA recombinante convencional.

Outros polipeptídeos multiméricos podem ser formados fundindo os polipeptídeos da invenção a uma sequência de polipeptídeo de zíper de leucina ou de zíper de isoleucina. Domínios de zíper de leucina e de zíper de
10 isoleucina são polipeptídeos que promovem multimerização das proteínas nas quais são encontrados. Exemplos não-limitantes de domínios de zíper de leucina adequados para produzir proteínas multiméricas solúveis da invenção são os descritos no pedido de patente internacional PCT WO Nº 94/10308, por este incorporado por meio de referência. Proteínas de fusão
15 recombinantes compreendendo um polipeptídeo da invenção fundido a uma sequência de polipeptídeo que dimeriza ou trimeriza em solução são expressadas em células hospedeiras adequadas, e a proteína de fusão multimérica solúvel resultante é recuperada do sobrenadante da cultura usando técnicas conhecidas na área.

20 Polipeptídeos multiméricos também podem ser gerados usando técnicas químicas conhecidas na área. Por exemplo, polipeptídeos desejados a serem contidos nos multímeros da invenção podem ser quimicamente reticulados usando moléculas encadeadoras e técnicas de otimização da extensão de moléculas encadeadoras conhecidas na área (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 5.478.925, a qual é aqui, a este pedido
25 de patente, incorporada por meio de referência em sua totalidade). Adicionalmente, polipeptídeos multiméricos também podem ser gerados introduzindo ligações dissulfeto entre os resíduos cisteína localizados dentro da sequência dos polipeptídeos que estão sendo usados para construir o polipeptídeo multimérico (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº
30 5.478.925, a qual é aqui, a este pedido de patente, incorporada por meio de referência em sua totalidade). Adicionalmente, polipeptídeos da invenção

podem ser modificados rotineiramente pela adição de cisteína ou biotina ao C-término ou N-término do polipeptídeo e técnicas conhecidas na área podem ser aplicadas para gerar multímeros contendo um ou mais destes polipeptídeos modificados (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 5.478.925, a qual é aqui, a este pedido de patente, incorporada por meio de referência em sua totalidade). Adicionalmente, outras técnicas conhecidas na área podem ser aplicadas para gerar lipossomas contendo os componentes do polipeptídeo que se deseja que seja contido no multímero da invenção (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº 5.478.925, a qual é aqui, a este pedido de patente, incorporada por meio de referência em sua totalidade).

Os polipeptídeos proporcionados aqui, neste pedido de patente, bem como os fragmentos dos mesmos, podem compreender adicionalmente elementos ligantes (L) que facilitam a fixação dos fragmentos a outras moléculas, aminoácidos, ou sequências de polipeptídeos. Os ligantes também podem ser usados para fixar os polipeptídeos, ou fragmentos dos mesmos, a matrizes de suporte sólido para uso em protocolos de purificação por afinidade. Exemplos não-limitantes de "ligantes" adequados para a prática da invenção incluem ligantes químicos (tais como os vendidos por Pierce, Rockford, IL), ou peptídeos que permitem para a conexão combinações de polipeptídeos (vide, por exemplo, ligantes tais como os revelados nas Patentes dos Estados Unidos nºs 6.121.424, 5.843.464, 5.750.352, e 5.990.275, por este incorporadas por meio de referência em sua totalidade).

Em outras modalidades, o elemento ligante (L) pode ser uma sequência de aminoácidos (um ligante de peptídeo). Em algumas modalidades, o ligante de peptídeo tem uma ou mais das seguintes características: a) permite a livre rotação dos polipeptídeos que encadeia (em relação um ao outro); b) é resistente ou suscetível à digestão (clivagem) por proteases; e c) não interage com os polipeptídeos que une juntos. Em várias modalidades, um constructo multimérico de acordo com a presente invenção inclui um ligante de peptídeo e o ligante de peptídeo tem 5 a 60 aminoácidos de extensão. Mais preferencialmente, o ligante de peptídeo tem 10 a 30, aminoácidos

de extensão; ainda mais preferencialmente, o ligante de peptídeo tem 10 a 20 aminoácidos de extensão. Em algumas modalidades, o ligante de peptídeo tem 17 aminoácidos de extensão.

Ligantes de peptídeo adequados para uso na presente invenção
5 são compostos de aminoácidos selecionados entre o grupo consistindo em Gly, Ser, Asn, Thr e Ala. Preferencialmente, o ligante de peptídeo inclui um elemento Gly-Ser. Em uma modalidade preferencial, o ligante de peptídeo compreende (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_y em que y é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8. Outras modalidades proporcionam um ligante de peptídeo compreendendo
10 ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_y-Ser-Pro). Em algumas modalidades preferenciais, y é um valor de 3, 4, ou 5. Em outra modalidade preferencial, o ligante de peptídeo compreende (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_y ou ((Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_y-Ser-Pro), em que y é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8. Em algumas modalidades preferenciais, y é um valor de 3, 4, ou 5. Onde elementos ligantes cliváveis são desejados, uma ou mais sequências de ligantes cliváveis tais como Fator Xa ou
15 enteroquinase (Invitrogen, San Diego Calif.) podem ser usadas sozinhas ou em combinação com os elementos supracitados.

Constructos multiméricos da presente invenção também podem compreender uma série de elementos de repetição, opcionalmente intercalados com outros elementos. Conforme seria reconhecido por uma pessoa
20 versada na técnica, a ordem na qual os elementos de repetição ocorrem no polipeptídeo multimérico não é crucial e qualquer disposição dos elementos de repetição conforme determinado aqui, neste pedido de patente, pode ser proporcionada pela presente invenção. Portanto, um "constructo multimérico" de acordo com a presente invenção pode proporcionar um polipeptídeo multimérico compreendendo uma série de polipeptídeos ou fragmentos de polipeptídeo que são, opcionalmente, unidos juntos por elementos ligantes
25 (quer elementos ligantes químicos ou elementos ligantes de aminoácidos).

Proteínas de fusão de acordo com a presente invenção compreendem uma ou mais sequências de polipeptídeos heterólogas (por exemplo,
30 etiquetas que facilitam a purificação dos polipeptídeos da invenção (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 6.342.362, por este incorporada

por meio de referência em sua totalidade; Altendorf *et al.*, (1999-WWW, 2000); Baneyx, (1999); Eihauer *et al.*, (2001); Jones *et al.* (1995); Margolin (2000); Puig *et al.*, (2001); Sassenfeld (1990); Sheibani (1999); Skerra *et al.*, (1999); Smith (1998); Smyth *et al.*, (2000); Unger (1997), cada uma das
5 quais é por este incorporada por meio de referência em suas totalidades), ou etiquetas disponíveis comercialmente a partir de vendedores tais como STRATAGENE (La Jolla, CA), NOVAGEN (Madison, WI), QIAGEN, Inc., (Valencia, CA), ou InVitrogen (San Diego, CA).

Em outras modalidades, polipeptídeos da presente invenção (por
10 exemplo, SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13, 15 ou fragmentos dos mesmos) podem ser fundidos a sequências de polipeptídeos heterólogas que têm atividade adjuvante (um polipeptídeo adjuvante). Exemplos não-limitantes de semelhantes polipeptídeos incluem proteínas de choque térmico (hsp) (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 6.524.825, cuja descrição é por
15 este incorporada por meio de referência em sua totalidade).

A presente invenção também proporciona fragmentos biologicamente ativos de um polipeptídeo de acordo com a invenção e inclui os peptídeos capazes de provocar uma reação imune dirigida contra um vírus West Nile, a referida reação imune proporcionando componentes (células B, anticorpos, e/ou componentes da reação imune celular (por exemplo, células T auxiliares, citotóxicas, e/ou supressoras)) reativa com o fragmento do referido polipeptídeo; o polipeptídeo não modificado intacto, de extensão total, revelado aqui, neste pedido de patente; ou tanto um fragmento de um polipeptídeo quanto os polipeptídeos não modificados intactos, de extensão total, revelados aqui, neste pedido de patente. Algumas modalidades proporcionam métodos para induzir uma reação de anticorpos que produz anticorpos neutralizantes do vírus West Nile.

O presente pedido também proporciona uma composição compreendendo no mínimo um polipeptídeo isolado, recombinante, ou purificado
30 compreendendo a SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 (ou um fragmento dos mesmos) e no mínimo um componente adicional. Em vários aspectos da invenção, o componente adicional é um suporte sólido (por exemplo, poços

de microtitulação, contas magnéticas, contas não magnéticas, contas agarose, vidro, celulose, plásticos, polietileno, polipropileno, poliéster, nitrocelulose, náilon, ou polissulfona). O componente adicional também pode ser um excipiente farmacologicamente aceitável ou adjuvante de conhecimento daqueles versados na técnica. Em alguns aspectos da invenção, o suporte sólido proporciona uma série de polipeptídeos da presente invenção ou uma série de polipeptídeos compreendendo combinações de vários polipeptídeos da presente invenção. Outros aspectos da invenção proporcionam uma composição compreendendo o polipeptídeo purificado que inclui componentes de células de planta (por exemplo, paredes celulares, a matriz celular de membranas de células vegetais e carboidratos, e etc.) ou componentes da matriz de células vegetais. Igualmente, onde são usados sistemas de expressão eucarióticos ou procarióticos para a produção de polipeptídeos ou fragmentos dos polipeptídeos proporcionados por este pedido, membrana celular ou componentes da parede celular de cada sistema de expressão respectivo podem estar presentes em uma composição compreendendo polipeptídeos parcialmente purificados.

A presente invenção também proporciona métodos para provocar uma reação imune em um indivíduo compreendendo a administração de composições compreendendo polipeptídeos de acordo com a presente invenção a um indivíduo em quantidades suficientes para induzir uma reação imune no indivíduo. Em algumas modalidades, uma "reação imune protetora" ou "terapêutica" é induzida no indivíduo. Uma "reação imune protetora" ou "reação imune terapêutica" se refere a uma indução na produção de anticorpos que neutralizam vírus West Nile infecciosos, ou induzem uma CTL (ou célula T CD8⁺) e/ou uma HTL (ou célula T CD4⁺), e/ou uma reação de anticorpos que previne, reduz ou no mínimo detém parcialmente sintomas de doença, efeitos colaterais ou progressão no indivíduos. Por exemplo, indivíduos nos quais uma reação imune protetora foi induzida podem apresentar mortalidade reduzida e/ou apresentar reduzida disseminação viral comparados com indivíduos de controle não-imunizados. A reação imune protetora também pode incluir uma reação de anticorpos que foi facilitada pela

estimulação de células T auxiliares (ou células T CD4⁺). Métodos adicionais para induzir uma reação imune em um indivíduo são ensinados na Patente dos Estados Unidos nº 6.419.931, incorporada a este por meio de referência em sua totalidade. O termo CTL pode ser usado de modo intercambiável com uma ou mais células T CD8⁺ e o termo HTL pode ser usado de modo intercambiável com uma ou mais células T CD4⁺ do início ao fim do presente pedido.

Indivíduos, no contexto deste pedido, se refere a aves e/ou mamíferos tais como, mas não limitados a, monos, chimpanzés, orangotangos, seres humanos, macacos ou animais domesticados (animais de estimação) tais como cães, gatos, porquinhos-da-índia, hamsters, coelhos, ferrets, vacas, cavalos, cabras e carneiro. Avícola ou ave é definido aqui, neste pedido de patente, como qualquer vertebrado de sangue quente membro da classe Aves tipicamente tendo membros anteriores modificados em asas, pernas escamosas, um bico, e produzindo crias em ovos de casca dura. Para os fins deste relatório, grupos preferenciais de aves são frangos domesticados, perus, avestruzes, patos, gansos, cisne, galinhas de competição da Cornualha e aves exóticas mantidas como animais de estimação ou para exibição em zoológicos.

Administração ou administrar é definido como a introdução de uma substância no corpo de um indivíduo e inclui vias oral, nasal, ocular, retal, vaginal e parenteral. Composições podem ser administradas individualmente ou em combinação com outros agentes através de qualquer via de administração, incluindo mas não limitada a subcutânea (SQ), intramuscular (IM), intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), intradérmica (ID), transdérmica, (TD), ou através da mucosa nasal, ocular, oral, ou retal.

A composição administrada ao indivíduo pode conter, opcionalmente, um adjuvante e pode ser liberada de qualquer maneira conhecida na técnica para a liberação de imunogênio a um sujeito. Composições também podem ser formuladas em quaisquer veículos, incluindo por exemplo, veículos farmacologicamente aceitáveis tais como os descritos em *Remington's Pharmaceutical Science* de E.W. Martin, Mack Publishing Company, Easton,

PA. Em modalidades preferenciais, as composições podem ser formuladas em adjuvante incompleto de Freund, adjuvante completo de Freund, ou alumínio. Outros exemplos não-limitantes de adjuvantes que podem ser usados na prática da invenção incluem: emulsões de óleo-água, Polygen, Carbigen (Carbopol 974P NF) ou Titer-Max (copolímero em bloco CRL-8941, esqualeno e um estabilizador de microparticulado único).

Em outras modalidades, a presente invenção proporciona ensaios de diagnóstico à base de formatos de *Western blot* ou imunoenaios de via de conhecimento do técnico versado e os quais utilizam um polipeptídeo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15. Por exemplo, ensaios à base de anticorpos tais como ensaios imunossorventes ligados a enzimas (ELISAs), radioimunoenaios (RIAs), ensaios de fluxo lateral, ensaio de ligação cromatográfica de fluxo reversível (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 5.726.010, a qual é por este incorporada por meio de referência em sua totalidade), ensaios de fitas imunocromatográficas, ensaios de fluxo automatizado, e ensaios utilizando biossensores contendo peptídeo podem ser empregados para a detecção de anticorpos que ligam aos polipeptídeos (ou fragmentos dos mesmos) que também são proporcionados pela presente invenção. As ensaios e métodos para conduzir os ensaios são de conhecimento geral na técnica e os métodos podem testar amostras biológicas (por exemplo, soro, plasma, ou sangue) qualitativamente (presença ou ausência de anticorpo) ou quantitativamente (comparação de uma amostra contra uma curva padrão preparada usando um polipeptídeo da presente invenção) para a presença de anticorpos que ligam a polipeptídeos da presente invenção.

Os ensaios à base de anticorpos podem ser considerados como sendo de quatro tipos: ensaios de ligação direta, ensaios intercalados, ensaios de competição, e ensaios de deslocamento. Em um ensaio de ligação direta, ou o anticorpo ou antígeno é etiquetado, e há um meio para medir o número de complexos formados. Em um ensaio intercalado, é medida a formação de um complexo de no mínimo três componentes (por exemplo, anticorpo-antígeno-anticorpo). Em um ensaio de competição, etiquetado antíge-

no e antígeno não etiquetado competem por ligação ao anticorpo, e é medido ou o componente ligado ou o livre. Em um ensaio de deslocamento, o antígeno etiquetado é pré-ligado ao anticorpo, e uma alteração na sinalização é medida à medida que o antígeno não etiquetado desloca o antígeno etiquetado ligado do receptor.

Ensaio de fluxo lateral podem ser conduzidos de acordo com os ensinamentos da Patente dos Estados Unidos nº 5.712.170 e as referências citadas na mesma. A Patente dos Estados Unidos nº 5.712.170 e as referências citadas na mesma são por este incorporadas por meio de referência em suas totalidades. Ensaio de deslocamento e imunossensores de fluxo úteis para realizar ensaios de deslocamento são descritos em: Kusterbeck *et al.*, (1990); Kusterbeck *et al.*, (1990a); Ligler *et al.*, (1992); Ogert *et al.*, (1992), todos os quais são incorporados aqui, a este pedido de patente, por meio de referência em suas totalidades. Ensaio de deslocamento e imunossensores de fluxo também são descritos na Patente dos Estados Unidos nº 5.183.740, a qual também é incorporada aqui, a este pedido de patente, por meio de referência em sua totalidade. O imunoensaio de deslocamento, diferentemente da maioria dos imunoensaios competitivos usados para detectar moléculas pequenas, pode gerar um sinal positivo com concentração crescente de antígeno.

A presente invenção também proporciona métodos para ligar um anticorpo a um polipeptídeo da presente invenção (por exemplo, SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, ou um fragmento de ligação de anticorpo do mesmo) compreendendo contactar uma amostra contendo um anticorpo com um polipeptídeo sob condições que permitem a formação de um complexo de antígeno-anticorpo. Estes métodos podem compreender adicionalmente a etapa de detectar a formação do referido complexo de antígeno-anticorpo. Em vários aspectos deste método, um imunoensaio é conduzido para a detecção de anticorpos específicos contra o vírus West Nile em uma amostra. Exemplos não-limitantes de semelhantes imunoensaios incluem ensaios imunossorventes ligados à enzima (ELISAs), radioimunoensaios (RIAs), ensaios de fluxo lateral, ensaios de fita imunocromatográfica, ensaios de fluxo automati-

zado, *Western blots*, ensaios de imunoprecipitação, ensaios de ligação cromatográfica de fluxo reversível, ensaios de aglutinação, e biossensores. Aspectos adicionais da invenção proporcionam o uso de uma série de polipeptídeos ao conduzir os métodos mencionados acima para detectar anticorpos específicos para o vírus West Nile (a série pode conter no mínimo um dos polipeptídeos determinados na SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 (ou fragmentos dos mesmos) e também pode conter outros polipeptídeos da mesma origem viral ou de origem viral diferente).

A presente invenção também refere-se a anticorpos que ligam a polipeptídeos da invenção. Anticorpos que são imunoespecíficos para os polipeptídeos conforme determinado aqui, neste pedido de patente, são especificamente contemplados. Em várias modalidades, são preferenciais anticorpos que não têm reação cruzada com outros polipeptídeos do vírus West Nile. Anticorpos particularmente preferenciais não têm reação cruzada com anticorpos produzidos contra polipeptídeos derivados de cepas conhecidas do vírus West Nile. Os anticorpos da presente invenção podem ser preparados usando materiais de via e métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, *Monoclonal Antibodies: Principles e Practice*, 1983; *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, 1982; *Selected Methods in Cellular Immunology*, 1980; *Immunological Methods, Vol. II*, 1981; *Practical Immunology*, e Kohler et al., 1975; Letchworth and Appleton, 1984). Estes anticorpos podem compreender adicionalmente um ou mais componentes adicionais, tais como um suporte sólido, um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável, ou uma etiqueta.

O termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de extensão total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpos na medida que apresentem a atividade biológica desejada, particularmente atividade neutralizante. "Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo de extensão total, geralmente a região variável ou de ligação de antígeno dos mesmos. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos

lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpos. Anticorpos particularmente preferenciais de acordo com a presente invenção são os que não ligam aos polipeptídeos de WNV não modificados conhecidos na técnica.

- 5 O termo "anticorpo monoclonal" conforme usado aqui, neste pedido de patente, se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto por possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em quantidades menores.
- 10 Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste com preparações de anticorpos (policlonais) convencionais que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante sobre o antígeno. O
- 15 "monoclonal" modificador indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, e não deve ser considerado como requerendo produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método do primeiro
- 20 hibridoma descrito por Kohler *et al.*, (1975), ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de fagos de anticorpos usando as técnicas descritas em Clackson *et al.* (1991) e Marks *et al.* (1991), por exemplo.
- 25 Os anticorpos monoclonais descritos aqui, neste pedido de patente, incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpos em particu-
- 30 lar, ao passo que o restante da uma ou mais cadeias é idêntico a ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes à outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como

fragmentos de semelhantes anticorpos, na medida que apresentem a atividade biológica desejada (Patente dos Estados Unidos nº 4.816.567; e Morrison *et al.*, (1984)). Também são incluídos anticorpos humanizados que ligam especificamente aos polipeptídeos, ou fragmentos dos mesmos, determinados em SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 (vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos nºs 6.407.213 ou 6.417.337, as quais são por este incorporadas por meio de referência em sua totalidade, ensinando métodos para produzir anticorpos humanizados).

Fragmentos de anticorpos "de cadeia única Fv" ou "sFv" compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende adicionalmente um polipeptídeo ligante entre os domínios V_H e V_L o qual permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão de sFv vide Pluckthun (1994).

O termo "diacorpos" se refere a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo (V_H-V_L). Diacorpos são descritos mais totalmente, por exemplo, na patente europeia EP nº 404.097; na publicação de patente internacional WO Nº 93/11161; e em Holliger *et al.* (1993). O termo "anticorpos lineares" se refere aos anticorpos descritos em Zapata *et al.* (1995).

Um anticorpo "isolado" é um anticorpo o qual foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais os quais interfeririam com usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em modalidades preferenciais, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo conforme determinado pelo método de Lowry, e o mais preferencialmente mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter no mínimo 15 resíduos de N-terminal ou sequência de aminoácidos interna por uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3)

até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não-redutoras usando azul Coomassie ou, preferencialmente, tintura prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes desde que no mínimo um componente do ambiente natural do anticorpo não
5 venha a estar presente. Ordinariamente, no entanto, anticorpo isolado será preparado por no mínimo uma etapa de purificação.

Conforme discutido acima, "sequência de nucleotídeos", "polinucleotídeo" ou "ácido nucleico" podem ser usados de modo intercambiável e são entendidos como significando, de acordo com a presente invenção, quer
10 um DNA de filamento duplo, um DNA de filamento único ou produtos de transcrição dos referidos DNAs (por exemplo, moléculas de RNA).

A faixa de percentagem de identidade, entre 20,00% e 99,99%, deve ser tomada como incluindo, e proporcionando descrição por escrito e suporte para, qualquer percentagem fracionária, em intervalos de 0,01%,
15 entre 20,00% e, até, inclusive 99,99%. Estas percentagens são puramente estatísticas e diferenças entre duas sequências de ácidos nucleicos podem ser distribuídas aleatoriamente e sobre toda a extensão da sequência. Por exemplo, sequências homólogas podem apresentar uma percentagem de identidade de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,
20 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99 por cento com as sequências da presente invenção. Tipicamente, a percentagem de identidade é calculada com referência ao polinucleotídeo de extensão total, nativo, e/ou que ocorre naturalmente. Os termos "idênticas" ou percentagem de "identidade", no contexto de duas ou mais sequências de polinucleotídeos ou polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou têm uma percentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos aminoácidos que são os
25 mesmos, quando comparados e alinhados para máxima correspondência em relação a uma janela de comparação, conforme medido usando um algoritmo de comparação de sequências ou por alinhamento manual e inspeção
30

visual.

Tanto homologias de sequências de proteína quanto de ácido nucleico podem ser avaliadas usando qualquer um da variedade de algoritmos de comparação de sequências e de programas conhecidos na técnica.

- 5 Os algoritmos e programas referidos incluem, mas não devem ser limitados de modo algum a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, e CLUSTALW (Pearson *et al.*, 1988; Altschul *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1996; Gish *et al.*, 1993). Comparações de sequências são, tipicamente, conduzidas usando parâmetros padrão proporcionados pelo vendedor ou
- 10 usando os parâmetros determinados nas referências identificadas acima, as quais são por este incorporadas por meio de referência em suas totalidades.

- Uma sequência de polinucleotídeos "complementar", conforme usado aqui, neste pedido de patente, geralmente se refere a uma sequência originária da ligação de hidrogênio entre uma purina particular e uma pirimidina particular em moléculas de ácido nucleico de filamento duplo (DNA-DNA, DNA-RNA, ou RNA-RNA). Os principais pareamentos específicos são
- 15 guanina com citosina e adenina com timina ou uracila. Uma sequência de polinucleotídeos "complementar" também pode ser referida como uma sequência de polinucleotídeos "antissenso" ou uma "sequência antissenso".

- 20 A homologia de sequência e identidade de sequência também podem ser determinadas por estudos de hibridização sob alta estringência, estringência intermediária, e/ou baixa estringência. Podem ser empregados vários graus de estringência de hibridização. As condições mais severas são, quanto maior a complementaridade que é requerida para formação de
- 25 duplex. A gravidade das condições pode ser controlada por temperatura, concentração da sonda, extensão da sonda, força iônica, tempo, e semelhantes. Preferencialmente, hibridização é conduzida sob condições de baixa estringência, estringência intermediária, ou de alta estringência por técnicas de conhecimento geral na área, conforme descrito, por exemplo, em Keller e
- 30 Manak (1987).

Por exemplo, hibridização de DNA imobilizado sobre Southern blots com sondas gene-específicas com etiqueta de ^{32}P pode ser realizada

por métodos de via (Maniatis *et al.*, 1982). Em geral, hibridização e subseqüentes lavagens podem ser realizadas sob condições de estringência intermediária a alta que permitem a detecção de sequências alvo com homologia com a sequência de polinucleotídeos exemplificada. Para sondas genéticas de DNA de filamento duplo, pode ser realizada hibridização de um dia para o outro em 20 a 25° C abaixo da temperatura de fusão (T_m) do híbrido de DNA em 6X SSPE, 5X solução de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de DNA desnaturado. A temperatura de fusão é descrita pela fórmula seguinte (Beltz *et al.*, 1983).

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{G+C}) - 0,61 (\% \text{ de formamida}) - 600 / \text{extensão de duplex em pares de bases.}$$

Lavagens são tipicamente realizadas como se segue:

(1) duas vezes em temperatura ambiente por 15 minutos em 1X SSPE, 0,1% de SDS (lavagem de baixa estringência);

(2) uma vez a $T_m - 20^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos em 0,2X SSPE, 0,1% de SDS (lavagem de estringência intermediária).

Para sondas de oligonucleotídeos, pode ser realizada hibridização de um dia para o outro em 10 a 20°C abaixo da temperatura de fusão (T_m) do híbrido em 6X SSPE, 5X solução de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de DNA desnaturado. A T_m para sondas de oligonucleotídeos pode ser determinada pela seguinte fórmula:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (\text{número de pares de bases T/A}) + 4 (\text{número de pares de bases G/C}) \text{ (Suggs } et al., 1981).$$

Lavagens podem ser realizadas como se segue:

(1) duas vezes em temperatura ambiente por 15 minutos 1X SSPE, 0,1% de SDS (lavagem de baixa estringência);

2) uma vez na temperatura de hibridização por 15 minutos em 1X SSPE, 0,1% de SDS (lavagem de estringência intermediária).

Em geral, sal e/ou temperatura podem ser alterados para mudar a estringência. Com um fragmento de DNA etiquetado >70 bases de extensão aproximadamente, podem ser usadas as seguintes condições:

Baixa: 1 ou 2X SSPE, temperatura ambiente

Baixa: 1 ou 2X SSPE, 42°C
 Intermediária: 0,2X ou 1X SSPE, 65°C
 Elevada: 0,1X SSPE, 65°C.

A título de outro exemplo não-limitante, procedimentos usando condições de alta estrigência também podem ser realizadas como se segue: Pré-hibridização de filtros contendo DNA é realizada por 8 h até durante a noite a 65°C em tampão composto de 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, e 500 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Os filtros são hibridizados por 48 h a 65°C, a temperatura de hibridização preferencial, em mistura pré-hibridização contendo 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado e 5-20 x 10⁶ cpm de sonda marcada com ³²P. Alternativamente, a etapa de hibridização pode ser realizada a 65°C na presença de tampão SSC, 1X SSC correspondendo a 0,15 M de NaCl e 0,05 M de citrato de Na. Subsequentemente, podem ser feitas lavagens de filtro a 37°C por 1 h em uma solução contendo 2X SSC, 0,01% de PVP, 0,01% de Ficoll, e 0,01% de BSA, seguidas por uma lavagem em 0,1X SSC a 50°C por 45 min. Alternativamente, podem ser realizadas lavagens de filtro em uma solução contendo 2X SSC e 0,1% de SDS, ou 0,5X SSC e 0,1% de SDS, ou 0,1X SSC e 0,1% de SDS a 68°C por intervalos de 15 minutos. Depois das etapas de lavagem, as sondas hibridizadas são detectáveis por autorradiografia. Outras condições de alta estrigência as quais podem ser usadas são de conhecimento geral na técnica e conforme citado em Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1989) são incorporadas aqui, a este pedido de patente, em sua totalidade.

Outro exemplo não-limitante de procedimentos usando condições de estrigência intermediária são como se segue: Filtros contendo DNA são pré-hibridizadas, e em seguida hibridizadas em uma temperatura de 60°C na presença de 5X um tampão SSC e sonda etiquetada. Subsequentemente, são realizadas lavagens dos filtros em uma solução contendo 2X SSC a 50°C e as sondas hibridizadas são detectáveis por autorradiografia. Outras condições de estrigência intermediária as quais podem ser usadas

são de conhecimento geral na técnica e conforme citado em Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1989) são incorporadas aqui, a este pedido de patente, em sua totalidade.

5 A formação de dúplex e a estabilidade dependem de complementaridade substancial entre os dois filamentos de um híbrido e, conforme mencionado acima, pode ser tolerado um certo grau de combinação inadequada. Portanto, as sequências de sondas da invenção em questão presente incluem mutações (tanto únicas quanto múltiplas), eliminações, inserções das sequências descritas, e combinações das mesmas, em que as referidas
10 mutações, inserções e eliminações permitem a formação de híbridos estáveis com o polinucleotídeo alvo de interesse. Mutações, inserções e eliminações podem ser produzidas em uma dada sequência de polinucleotídeos em muitos modos, e estes métodos são de conhecimento de um profissional ordinariamente versado. Outros métodos podem se tornar conhecidos no
15 futuro.

Também é de conhecimento geral na técnica que enzimas de restrição podem ser usadas para obter fragmentos funcionais das sequências de DNA em questão presente. Por exemplo, exonuclease *Bal31* pode ser usada convenientemente para digestão de DNA limitada controlada com
20 o tempo (referidos comumente como procedimentos de "apagar uma base"). Vide, por exemplo, Maniatis *et al.* (1982); Wei *et al.* (1983).

A presente invenção compreende adicionalmente fragmentos das sequências de polinucleotídeos da presente invenção. Fragmentos típicos das sequências de polinucleotídeos de acordo com a invenção serão
25 entendidos como significando qualquer fragmento de nucleotídeo tendo no mínimo 5 nucleotídeos sucessivos, preferencialmente no mínimo 12 nucleotídeos sucessivos, e ainda mais preferencialmente no mínimo 15, 18, ou no mínimo 20 nucleotídeos sucessivos da sequência da qual é derivado. O limite superior para fragmentos conforme determinado aqui, neste pedido de
30 patente, é o número total de nucleotídeos encontrados na sequência de extensão total codificando um polipeptídeo em particular (por exemplo, um polipeptídeo tal como o de SEQ ID NO: 5).

Em algumas modalidades, a presente invenção inclui os fragmentos capazes de hibridizar sob várias condições de condições de estrin-
gência (por exemplo, estrinência alta ou intermediária ou baixa) com uma
sequência de nucleotídeos de acordo com a invenção; fragmentos que hibri-
5 dizam com uma sequência de nucleotídeos da presente invenção podem
ser, opcionalmente, etiquetados conforme determinado abaixo.

A presente invenção proporciona, em uma modalidade, métodos
para a identificação da presença de ácidos nucleicos de acordo com a pre-
sente invenção em células hospedeiras transformadas ou em células isola-
10 das de um indivíduo suspeito de ser infectado por vírus West Nile. Nestas
modalidades variadas, a invenção proporciona a detecção de ácidos nucle-
icos em uma amostra (obtida do indivíduo ou de uma cultura celular) com-
preendendo contactar uma amostra com um ácido nucleico (polinucleotídeo)
da presente invenção (tal como um RNA, mRNA, DNA, cDNA, ou outro ácido
15 nucleico). Em uma modalidade preferencial, o polinucleotídeo é uma sonda
que é, opcionalmente, etiquetado e usado no sistema de detecção. Existem
muitos métodos para detecção de ácidos nucleicos e qualquer método ade-
quado para detecção é englobado pela presente invenção. Formatos de en-
saio típicos utilizando hibridização de ácido nucleico incluem, e não estão
20 limitados a, 1) ensaio de *run on* nuclear, 2) ensaio de *slot blot*, 3) ensaio *Nor-*
thern blot (Alwine *et al.*, 1977, 4) separação de partículas magnéticas, 5)
chips de DNA ou ácido nucleico, 6) ensaio *Northern blot* reverso, 7) ensaio
de *dot blot*, 8) hibridização *in situ*, 9) ensaio de proteção de RNase (Melton
et al., 1984) e conforme descrito no catálogo de 1998 da Ambion, Inc., Aus-
25 tin, Tex., 10) reação de cadeia ligase, 11) reação de cadeia polimerase (P-
CR), 12) transcriptase reversa (RT)-PCR (Berchtold, 1989), 13) RT-PCR de
display diferencial (DDRT-PCR) ou outras combinações adequadas de técni-
cas e ensaios. Etiquetas adequadas para uso nestas metodologias de de-
tecção incluem, e não estão limitados a 1) etiquetas radioativas, 2) etiquetas
30 enzimáticas, 3) etiquetas quimiluminescentes, 4) etiquetas fluorescentes, 5)
etiquetas magnéticas, ou outras etiquetas adequadas, incluindo as determi-
nadas abaixo. Estas metodologias e etiquetas são de conhecimento geral na

técnica e estão amplamente disponíveis para o técnico versado. Igualmente, métodos para incorporar etiquetas nos ácidos nucleicos também são de conhecimento geral do técnico versado.

Portanto, a presente invenção também proporciona sondas de
5 detecção (por exemplo, fragmentos das sequências de polinucleotídeos reveladas) para hibridização com uma sequência-alvo ou o amplicon gerado a partir da sequência-alvo. Uma sonda de detecção semelhante compreenderá um trecho contíguo / consecutivo de no mínimo 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65,
10 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 nucleotídeos. Sondas etiquetadas ou iniciadores são etiquetados com um composto radioativo ou com outro tipo de etiqueta conforme determinado acima (por exemplo, 1) etiquetas radioativas, 2) etiquetas enzimáticas, 3) etiquetas quimiluminescentes, 4) etiquetas fluorescentes, ou 5) etiquetas magnéticas). Alternativamente, sequências de nucle-
15 otídeos não marcadas podem ser usadas diretamente como sondas ou iniciadores; no entanto, as sequências são geralmente etiquetadas com um elemento radioativo (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) ou com uma molécula tal como biotina, acetilaminofluoreno, digoxigenina, 5-bromo-deoxiuridina, ou fluoresceína para proporcionar sondas que podem ser usadas em numerosas aplicações.

20 Polinucleotídeos da presente invenção também podem ser usados para a análise qualitativa e quantitativa da expressão genética usando séries ou polinucleotídeos que são fixados a um suporte sólido. Conforme usado aqui, neste pedido de patente, o termo série significa uma disposição uni-, bi-, ou multidimensional de polinucleotídeos de extensão total ou poli-
25 nucleotídeos de suficiente extensão para permitir detecção específica de expressão genética. Preferencialmente, os fragmentos têm no mínimo 15 nucleotídeos de extensão. Mais preferencialmente, os fragmentos têm no mínimo 100 nucleotídeos de extensão. Mais preferencialmente, os fragmentos têm mais de 100 nucleotídeos de extensão. Em algumas modalidades os
30 fragmentos podem ter mais de 500 nucleotídeos de extensão.

Por exemplo, pode ser realizada análise quantitativa da expressão genética com polinucleotídeos de extensão total da presente invenção,

ou fragmentos dos mesmos, em uma microssérie de DNA complementar conforme descrito por Schena *et al.* (1995, 1996). Polinucleotídeos, ou fragmentos dos mesmos, são amplificados por PCR e ordenados sobre placas de microscópio sililadas. Séries impressas são incubadas em uma câmara
5 úmida para permitir reidratação dos elementos da série e enxaguadas, uma vez em 0,2% de SDS por 1 min, duas vezes em água por 1 min e uma vez por 5 min em solução de boridreto de sódio. As séries são submergidas em água por 2 min a 95°C, transferidas para 0,2% de SDS por 1 min, enxaguadas duas vezes com água, secos ao ar e armazenadas no escuro a 25°C.

10 mRNA é isolado de uma amostra biológica e sondas são preparadas por uma única rodada de transcrição reversa. Sondas são hibridizadas para microsséries de 1 cm² sob uma sobrelâmina de vidro de 14 x 14 mm por 6 a 12 horas a 60°C. As séries são lavadas por 5 min a 25°C em tampão de lavagem de baixa estringência (1 x SSC / 0,2% de SDS), em seguida por
15 10 min em temperatura ambiente em tampão de lavagem de alta estringência (0,1 x SSC / 0,2% de SDS). As séries são varridas em 0,1 x SSC usando um dispositivo de varredura a laser de fluorescência equipado com uma série de filtro habitual. Medições de expressão diferencial precisa são obtidas tomando a média das proporções de duas hibridizações independentes.

20 Análise quantitativa dos polinucleotídeos presentes em uma amostra biológica também pode ser realizada em séries de DNA complementar conforme descrito por Pietu *et al.* (1996). Os polinucleotídeos da invenção, ou fragmentos dos mesmos, são amplificados por PCR e pincelados sobre membranas. Em seguida, mRNAs originários de amostras biológicas
25 derivadas de vários tecidos ou células são etiquetados com nucleotídeos radioativos. Depois de hibridização e lavagem em condições controladas, os mRNAs hibridizados são detectados por fosfo-imaging ou autorradiografia. São realizados experimentos em duplicata e em seguida é realizada uma análise quantitativa de mRNAs expressados diferencialmente.

30 Alternativamente, as sequências de polinucleotídeos da invenção também podem ser usadas em sistemas analíticos, tais como chips de DNA. Chips de DNA e seus usos são de conhecimento geral na técnica (vi-

de, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos nºs 5.561.071; 5.753.439; 6.214.545; Schena 1996; Bianchi *et al.*, 1997; cada uma das quais é por este incorporada por meio de referência em suas totalidades) e/ou também proporcionadas por vendedores comerciais tais como Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA). Além disso, as sequências de ácido nucleico da presente invenção podem ser usadas como marcadores de peso molecular em procedimentos de análise de ácido nucleico.

A presente invenção também proporciona composições de substâncias que compreendem:

10 a) uma sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou codificando um ou mais fragmentos de polipeptídeo de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 conforme determinado na Tabela 9, 10, 11, 12, 15, ou 16. Em vários aspectos da invenção, estes polinucleotídeos podem ter um teor de G+C de no mínimo 15 40% e menos de 50% ou um teor de G+C conforme determinado na Tabela 13;

b) uma sequência de polinucleotídeos que é no mínimo 70% (ou uma percentagem conforme especificado na Tabela 14) idêntica à SEQ ID NO: 1, codifica um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 2 e tem um 20 teor de G+C de entre cerca de 40% e cerca de 50% (ou um teor específico de G+C conforme especificado na Tabela 13);

c) uma sequência de polinucleotídeos no mínimo 8 nucleotídeos consecutivos de uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (a) ou (b);

25 d) uma sequência de polinucleotídeos compreendendo SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, ou 12 ou um fragmento de no mínimo 8 nucleotídeos consecutivos de SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, ou 12;

e) um polinucleotídeo que é complementar aos polinucleotídeos determinados em (a), (b), (c), ou (d);

30 f) um polinucleotídeo que hibridiza sob baixa, intermediária ou elevada estringência com uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (a), (b), (c), (d) ou (e);

g) um constructo genético compreendendo uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (a), (b), (c), (d) ou (e);

h) um vetor compreendendo um polinucleotídeo ou constructo genético conforme determinado em (a), (b), (c), (d), (e), (f) ou (g);

5 i) uma célula hospedeira compreendendo um vetor conforme determinado em (h), um constructo genético conforme determinado em (g), ou um polinucleotídeo conforme determinado em qualquer uma de (a), (b), (c), (d) ou (e);

10 j) uma planta transgênica, célula de planta, ou parte de planta compreendendo um vetor conforme determinado em (h), um constructo genético conforme determinado em (g) ou um polinucleotídeo conforme determinado em qualquer uma de (a), (b), (c), (d) ou (e); ou

k) uma sonda compreendendo um polinucleotídeo de acordo com (a), (b), (c), (d), (e) ou (f) e, opcionalmente, uma etiqueta ou marcador.

15 A presente invenção também proporciona constructos genéticos compreendendo: a) uma sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, ou um fragmento dos mesmos; b) uma sequência de polinucleotídeos tendo no mínimo cerca de 20% a 99,99% de identidade com uma sequência de polinucleotídeos
20 codificando um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, em que o referido polipeptídeo tem no mínimo uma das atividades biológicas de um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, ou um fragmento dos mesmos; c) uma sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo ten-
25 do no mínimo cerca de 20% a 99,99% de identidade com um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, em que o referido polipeptídeo tem no mínimo uma das atividades biológicas de um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, ou um fragmento dos mesmos; d) uma sequência de polinu-
30 cleotídeos codificando um fragmento de um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15, em que o referido fragmento tem no mínimo uma das atividades do polipeptídeo de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; e)

uma sequência de polinucleotídeos compreendendo SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, ou 14; f) uma sequência de polinucleotídeos tendo no mínimo cerca de 20% a 99,99% de identidade com a sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, ou 14; g) uma sequência de polinucleotídeos codificando constructo multimérico; ou h) um polinucleotídeo que é complementar aos polinucleotídeos determinados em (a), (b), (c), (d), (e), (f), ou (g). Constructos genéticos da presente invenção também pode conter elementos regulatórios adicionais tais como promotores e reforçadores e, opcionalmente, marcadores selecionáveis.

10 Também dentro do âmbito da presente presente invenção estão vetores ou cassetes de expressão contendo constructos genéticos conforme determinado aqui, neste pedido de patente, ou polinucleotídeos codificando os polipeptídeos, determinados acima, encadeados operavelmente a elementos regulatórios. Os vetores e cassetes de expressão podem conter se-
 15 quências de controle transcricional adicional também. Os vetores e cassetes de expressão podem compreender adicionalmente marcadores selecionáveis. O cassete de expressão pode conter no mínimo um gene adicional, encadeado operavelmente a elementos de controle, a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o um ou mais genes adicionais e um ou
 20 mais elementos de controle podem ser proporcionados sobre múltiplos cassetes de expressão. Os cassetes de expressão referidos também podem ser proporcionados com uma pluralidade de sítios de restrição para inserção das sequências da invenção a estarem sob a regulação transcricional das regiões regulatórias. O um ou mais cassetes de expressão podem conter adicio-
 25 nalmente genes marcadores selecionáveis encadeados operavelmente a elementos de controle.

O cassete de expressão incluirá na direção de transcrição 5'-3', uma região de iniciação transcricional e translacional, uma sequência de DNA da invenção, e regiões de terminação transcricional e translacional. A
 30 região de iniciação transcricional, o promotor, pode ser nativa ou análoga, ou estranha ou heteróloga, à célula hospedeira. Adicionalmente, o promotor pode ser a sequência natural ou alternativamente uma sequência sintética.

Por "estranha" se pretende que a região de iniciação transcricional não é encontrada na planta nativa na qual a região de iniciação transcricional é introduzida. Conforme usado aqui, neste pedido de patente, um gene quimérico compreende uma sequência codificante ligada operavelmente a uma
5 região de iniciação transcricional que é heteróloga à sequência codificante.

Outro aspecto da invenção proporciona vetores para a clonagem e/ou a expressão de uma sequência de polinucleotídeos ensinada aqui, neste pedido de patente. Vetores desta invenção, incluindo vetores de vacina, também podem compreender elementos necessários que permitem a ex-
10 pressão e/ou a secreção das referidas sequências de nucleotídeos em uma dada célula hospedeira. O vetor pode conter um promotor, sinais para iniciação e para terminação de translação, bem como regiões apropriadas para regulação de transcrição. Em algumas modalidades, os vetores podem ser mantidos estavelmente na célula hospedeira e, opcionalmente, podem con-
15 ter sequências de sinal dirigindo a secreção da proteína traduzida. Estes diferentes elementos são escolhidos de acordo com a célula hospedeira usada. Vetores podem se integrar no genoma hospedeiro ou, opcionalmente, ser vetores que se replicam autonomamente.

A presente invenção também proporciona a expressão de um
20 polipeptídeo ou fragmento de peptídeo codificado por uma sequência de polinucleotídeos revelada aqui, neste pedido de patente, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira transformada com um polinucleotídeo da presente invenção sob condições que permitem a expressão do polipeptídeo e, opcionalmente, recuperando o polipeptídeo expressado.

25 As sequências de polinucleotídeos reveladas também podem ser reguladas por uma segunda sequência de ácido nucleico de modo que a proteína ou peptídeo seja expressado em um hospedeiro transformado com a molécula de DNA recombinante. Por exemplo, expressão de uma proteína ou peptídeo pode ser controlada por qualquer promotor / elemento reforça-
30 dor conhecido na técnica. Promotores os quais podem ser usados para controlar expressão incluem, mas não estão limitados a, o promotor CMV-IE, a região do promotor precoce SV40 (Benoist e Chambon 1981), o promotor

contido na repetição terminal 3' de extensão do Rous sarcoma vírus (Yamamoto *et al.*, 1980), o promotor de timidina quinase de herpes simples (Wagner *et al.*, 1981), as sequências regulatórias do gene de metalotioneína (Brinster *et al.*, 1982); vetores procarióticos contendo promotores tais como o

5 promotor de β -lactamase (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978), ou o promotor *tac* (deBoer *et al.*, 1983); vide também "*Useful proteins from recombinant bacteria*" em Scientific American, 1980, 242:74-94; vetores de expressão em planta compreendendo a região promotora de nopalina sintetase (Herrera-Estrella *et al.*, 1983) ou o promotor de RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Gardner *et al.*, 1981), e o promotor da enzima fotossintética ribulose

10 bifosfato carboxilase (Herrera-Estrella *et al.*, 1984); elementos promotores de levedura ou fungos tais como o promotor Gal 4, o promotor ADC (álcool desidrogenase), promotor PGK (fosfoglicerol quinase), e/ou o promotor da fosfatase alcalina.

15 Os vetores de acordo com a invenção são, por exemplo, vetores de origem viral ou de plasmídeo. Em uma modalidade específica, é usado um vetor que compreende um promotor encadeado operavelmente a uma sequência de ácido nucleico codificando proteína ou peptídeo contida dentro das sequências de polinucleotídeos reveladas, uma ou mais origens de re-

20 plicação, e, opcionalmente, um ou mais marcadores selecionáveis (por exemplo, um gene de resistência a antibiótico). Vetores de expressão compreendem sequências regulatórias que controlam expressão genética, inclusive expressão genética em uma célula hospedeira desejada. Vetores exemplares para a expressão dos polipeptídeos da invenção incluem os vetores

25 de plasmídeo do tipo pET (Promega) ou vetores de plasmídeo pBAD (Invitrogen) ou os proporcionados nos exemplos abaixo. Além disso, os vetores de acordo com a invenção são úteis para transformar células hospedeiras de modo a clonar ou expressar as sequências de polinucleotídeos da invenção.

A invenção também engloba as células hospedeiras transforma-

30 das por um vetor de acordo com a invenção. Estas células podem ser obtidas introduzindo em células hospedeiras uma sequência de nucleotídeos inserida em um vetor conforme definido acima, e em seguida cultivando as

células referidas sob condições que permitem a replicação e/ou a expressão das sequências de polinucleotídeos da presente invenção.

A célula hospedeira pode ser escolhida entre sistemas eucarióticos ou procarióticos, tais como por exemplo, células bacterianas, (Gram-negativa ou Gram-positiva), células de levedura (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*), células animais (tais como células de ovário de hamster Chinês (CHO)), células de plantas, e/ou células de inseto usando vetores de baculovírus. Em algumas modalidades, as células hospedeiras para expressão dos polipeptídeos incluem, e não estão limitadas a, aquelas ensinadas nas Patentes dos Estados Unidos nºs 6.319.691, 6.277.375, 5.643.570, ou 5.565.335, cada uma das quais é incorporada por meio de referência em sua totalidade, incluindo todas as referências citadas dentro de cada patente respectiva.

Além disso, pode ser escolhida uma cepa de célula hospedeira a qual modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto genético no modo específico desejado. A expressão de alguns promotores pode ser elevada na presença de alguns indutores; portanto, a expressão do polipeptídeo produzido por engenharia genética pode ser controlada. Além do mais, diferentes células hospedeiras têm mecanismos característicos e específicos para o processamento translacional e pós-translacional e modificação (por exemplo, glicosilação, fosforilação) de proteínas. Linhagens celulares apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para assegurar a modificação e processamento desejados da proteína estranha expressada. Por exemplo, a expressão em um sistema bacteriano pode ser usado para produzir um produto de proteína de núcleo não glicosilado. A expressão em levedura produzirá um produto glicosilado. A expressão em células de mamífero pode ser usada para assegurar glicosilação "nativa" de uma proteína heteróloga. Além do mais, diferentes sistemas de expressão de vetor / hospedeiro podem efetuar reações de processamento para diferentes extensões.

Também são proporcionadas células de planta transformadas, sementes transgênicas, partes de planta transgênica e plantas transgênicas

as quais contêm uma ou mais sequências de polinucleotídeos, constructo genético, vetor, ou cassete de expressão compreendendo um ou mais dos polinucleotídeos revelados aqui, neste pedido de patente, ou fragmentos biologicamente ativos dos mesmos, encadeados operavelmente a elementos de controle. Conforme usado aqui, neste pedido de patente, o termo "planta" inclui algas e plantas maiores (incluindo, mas não limitado a árvores). Deste modo, algas, monocotiledôneas, e dicotiledôneas podem ser transformadas com constructos genéticos da invenção, cassetes de expressão, ou vetores de acordo com a invenção. Em algumas modalidades preferenciais, plantas de tabaco ou linhagens de células de tabaco são transformadas com constructos genéticos de acordo com a presente invenção.

Portanto, polipeptídeos úteis na produção das composições ou protocolos de imunização discutidos neste pedido podem ser derivados ou obtidos a partir de uma célula de planta transgênica que foi produzida por engenharia genética para expressar um polipeptídeo compreendendo (consistindo essencialmente em ou consistindo em) SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, ou fragmentos dos mesmos. Vide, por exemplo, a Publicação do pedido de Patente dos Estados Unidos No: 2004/0268442 A1, cuja revelação é por este incorporada por meio de referência em sua totalidade.

Planta transgênica é aqui, neste pedido de patente, definida como uma cultura de células de planta, linhagem de células de planta, cultura de tecido de planta, planta inferior, planta monocotiledônea, planta dicotiledônea, ou progênie ou parte das mesmas derivadas de uma célula de planta transformada ou protoplasto, em que o genoma da planta transformada contém DNA estranho, introduzido por técnicas de laboratório, não presente originalmente em uma célula transgênica nativa, não-vegetal da mesma espécie. Os termos "planta transgênica" e "planta transformada" têm sido usados algumas vezes na técnica como termos sinônimos para definir uma planta cujo DNA contém uma molécula de DNA exógena. Onde apropriado, os polinucleotídeos codificando os polipeptídeos determinados aqui, neste pedido de patente, podem ser otimizados para expressão nas plantas transformadas, células de plantas ou partes de plantas. Isto é, os genes podem ser sin-

tetizados usando códonos para espécies preferenciais correspondentes às espécies de interesse. Estão disponíveis métodos na técnica para sintetizar, por exemplo, genes preferenciais para plantas. Vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos nºs 5.380.831 e 5.436.391, e Murray *et al.* (1989),
5 incorporadas aqui, a este pedido de patente, por meio de referência.

A construção de cassetes genéticos para expressar polipeptídeos em plantas é prontamente realizada utilizando métodos de conhecimento geral, tais como os revelados em Sambrook *et al.* (1989); e Ausubel *et al.* (1987).

10 Ao preparar os constructos desta invenção, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados, de modo a proporcionar as sequências de DNA na orientação apropriada, conforme adequado, na estrutura de leitura apropriada. Adaptadores ou ligantes podem ser empregados para unir os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem ser envolvidos para pro-
15 porcionar sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, ou semelhantes.

Ao realizar as várias etapas, se emprega clonagem, de modo a amplificar um vetor contendo o promotor / gene de interesse para subse-
quente introdução nas células hospedeiras desejadas. Uma ampla variedade
20 de vetores de clonagem estão disponíveis, onde o vetor de clonagem inclui um sistema de replicação funcional em *Escherichia coli* (*E. coli*) e um marcador o qual permite a seleção das células transformadas. Vetores ilustrati-
vos incluem pBR322, série pUC, pACYC184, série Bluescript (Stratagene) e etc. Portanto, a sequência pode ser inserida no vetor em um ou mais sítios
25 de restrição apropriados, o plasmídeo resultante usado para transformar o hospedeiro de *E. coli* (por exemplo, *E. coli* cepas HB101, JM101 e DH5 α), a *E. coli* cultivada em um meio nutriente apropriado e as células colhidas e lisadas e o plasmídeo recuperado. A análise pode envolver análise de se-
quência, análise de restrição, eletroforese, ou semelhantes. Depois de cada
30 manipulação, a sequência de DNA a ser usada no constructo final pode ser restrita e unida à próxima sequência, onde cada um dos constructos parciais pode ser clonado no mesmo ou em diferentes plasmídeos.

Vetores estão disponíveis ou podem ser prontamente preparados para transformação de células de plantas. Em geral, plasmídeo ou vetores virais devem conter todas as sequências de controle de DNA necessárias tanto para manutenção quanto expressão de uma sequência de DNA heteróloga em um dado hospedeiro. As sequências de controle referidas geralmente incluem uma sequência líder e uma sequência de DNA codificando para códon de sinal de iniciação de translação, um códon terminador de translação, e uma sequência de DNA codificando para um sinal 3' UTR controlando o processamento de RNA mensageiro. A seleção de elementos apropriados para otimizar expressão em qualquer espécie particular é um questão de conhecimento ordinário na técnica utilizando os ensinamentos desta descoberta. Finalmente, os vetores devem ter desejavelmente um gene marcador que é capaz de proporcionar uma propriedade fenotípica a qual permite a identificação de células hospedeiras contendo o vetor.

A atividade da sequência codificante estranha inserida nas células de plantas é dependente da influência de DNA de planta endógeno adjacente ao inserto. Geralmente, a inserção de genes heterólogos parece ser aleatória usando qualquer técnica de transformação; no entanto, existe tecnologia para produzir plantas com recombinação de sítio específica de DNA em células de plantas (vide a publicação de patente internacional WO Nº 91/09957). Qualquer método ou combinação de métodos resultante na expressão da sequência ou sequências desejadas sob o controle do promotor é aceitável.

A presente invenção não está limitada a qualquer método particular para transformar células de plantas. A tecnologia para introduzir DNA em células de plantas é de conhecimento geral daqueles versados na técnica. Foram descritos quatro métodos básicos para liberar DNA estranho dentro das células de plantas. Métodos químicos (Graham and van der Eb, 1973; Zatloukal *et al.*, 1992); métodos físicos incluindo microinjeção (Capecchi, 1980), eletroporação (Wong e Neumann 1982; Fromm *et al.*, 1985; Patente dos Estados Unidos nº 5.384.253) e a pistola genética (Johnston and Tang, 1994; Fynan *et al.*, 1993); métodos virais (Clapp, 1993; Lu *et al.*, 1993;

Eglitis and Anderson 1988; Eglitis *et al.*, 1988); e métodos mediados por receptor (Curiel *et al.*, 1991; Curiel *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1992).

A introdução de DNA em células de plantas por meios de eletroporação é de conhecimento geral daqueles versados na técnica. Enzimas de
5 degradação da parede de células vegetais, tais como enzimas de degradação de pectina, são usadas por render células recientes mais suscetíveis à transformação por eletroporação do que células não-tratadas. Para realizar transformação por eletroporação pode-se empregar ou tecidos friáveis tais como uma cultura de suspensão de células, ou calo embriogênico, ou em-
10 briões imaturos ou outros tecidos organizados diretamente. Geralmente é necessário degradar parcialmente as paredes celulares do material da planta alvo com enzimas de degradação de pectina ou ferindo mecanicamente em uma maneira controlada. O material de planta tratado referido está pronto para receber DNA estranho por eletroporação.

15 Outro método para liberar DNA transformante estranho para células de plantas é por bombardeamento de microprojéteis. Neste método, micropartículas são revestidas com DNA estranho e liberadas dentro de células por uma força propelente. As micro partículas referidas são tipicamente compostas de tungstênio, ouro, platina, e metais similares. Uma vantagem
20 do bombardeamento de microprojéteis é que não é necessário nem o isolamento de protoplastos (Cristou *et al.*, 1988) nem a suscetibilidade à infecção por *Agrobacterium*. Uma modalidade ilustrativa de um método para liberar DNA em células de milho por aceleração é um Sistema de Liberação de Partículas Biolistics (Biolistics Particle Delivery System), o qual pode ser usado
25 para impelir partículas revestidas com DNA ou células através de uma tela sobre uma superfície de filtro coberta com células de milho cultivadas em suspensão. A tela dispersa as partículas de modo que não sejam liberadas para as células receptoras em grandes agregados. Para o bombardeamento, células em suspensão são preferencialmente concentradas sobre filtros ou
30 meio de cultura sólido. Alternativamente, embriões imaturos ou outras células-alvo podem ser arranjados sobre meio de cultura sólido. As células a serem bombardeadas são posicionadas em uma distância apropriada abaixo

da placa de parada de macroprojéteis. Em transformação de bombardeamento, pode-se otimizar as condições de cultura pré-bombardeamento e os parâmetros de bombardeamento para produzir os números máximos de transformantes estáveis. Tanto os parâmetros físicos quanto biológicos para bombardeamento são importantes nesta tecnologia. Fatores físicos são os que envolvem manipular o precipitado de DNA / microprojétil ou os que afetam o voo e a velocidade de quaisquer dos microprojéteis. Fatores biológicos incluem todas as etapas envolvidas na manipulação de células antes e imediatamente depois de bombardeamento, o ajuste osmótico de células-alvo para ajudar a aliviar o trauma associado com bombardeamento, e também a natureza do DNA transformante, tal como DNA linearizado ou plasmídeos superespiralados intactos.

Transferência mediada por *Agrobacterium* é um sistema amplamente aplicável para introduzir DNA estranho em células de plantas porque o DNA pode ser introduzido em tecidos de planta saudáveis, eliminando a necessidade de regenerar uma planta intacta de um protoplasto. O uso de vetores integrando plantas mediadas por *Agrobacterium* para introduzir DNA em células de plantas é de conhecimento geral na técnica. Vide, por exemplo, os métodos descritos em Fraley *et al.* (1985) e Rogers *et al.* (1987). Adicionalmente, a integração do Ti-DNA é um processo relativamente preciso resultando em poucas redistribuições. A região de DNA a ser transferida é definida pelas sequências de borda, e DNA intermediário é geralmente inserido no genoma da planta conforme descrito em Spielmann *et al.* (1986) e Jorgensen *et al.* (1987).

Vetores de transformação de *Agrobacterium* modernos são capazes de replicação em *E. coli* bem como *Agrobacterium*, permitindo manipulações convenientes. Além disso, recentes avanços tecnológicos em vetores para transferência genética mediada por *Agrobacterium* aprimoraram a disposição de genes e sítios de restrição nos vetores para facilitar a construção de vetores capazes de expressar várias proteínas ou polipeptídeos. Regiões multiligantes convenientes flanqueadas por um promotor e um sítio de poliadenilação para expressão direta de genes codificando polipeptídeos

inseridos são adequados para os presentes fins. Além disso, *Agrobacterium* contendo tanto genes Ti armados quanto desarmados podem ser usados para as transformações.

5 A transformação de protoplastos de plantas pode ser obtida usando métodos baseados em precipitação de fosfato de cálcio, tratamento de polietileno glicol, eletroporação, e combinações destes tratamentos (vide, por exemplo, Potrykus *et al.*, 1985; Marcotte *et al.*, 1988). A aplicação destes sistemas a diferentes espécies de plantas depende da capacidade para regenerar as espécies particulares de protoplastos.

10 Uma vez que as células de plantas tenham sido transformadas, selecionadas e verificadas para expressão de antígeno, é possível em alguns casos regenerar plantas férteis saudáveis. Isto dependerá grandemente das espécies de plantas escolhidas. Métodos para regenerar numerosas espécies de plantas foram relatados na literatura e são de conhecimento
15 geral do técnico versado. Para a prática da presente invenção, é preferencial transformar linhagens de células de plantas que podem ser cultivadas e escaladas rapidamente evitando a etapa de regeneração geralmente longa. Além disso, o uso de culturas de células de plantas evita produção em campo aberto e reduz grandemente as probabilidades de fuga genética e contaminação alimentar. Culturas de células de suspensão de tabaco tais como
20 NT-1 e BY-2 (An, 1985) são preferenciais porque estas linhagens são particularmente suscetíveis a manuseio em cultura, são prontamente transformadas, produzem eventos integrados estavelmente e são suscetíveis a criopreservação.

25 A linhagem celular de suspensão de tabaco, NT-1, é adequada para a prática da presente invenção. Células NT-1 foram originalmente desenvolvidas a partir de *Nicotiana tabacum* L.cv. amarelo brilhante 2. A linhagem celular NT-1 é amplamente usada e está prontamente disponível; embora, qualquer linhagem celular de suspensão de tabaco seja consistente
30 com a prática da invenção. Células NT-1 adequadas para uso nos exemplos abaixo estão disponíveis na American Type Culture Collection sob o número de acesso ATCC nº 74840. Vide também a Patente dos Estados Unidos nº

6.140.075, aqui, neste pedido de patente, incorporada por meio de referência em sua totalidade.

Têm sido descritos muitas técnicas de cultura de células de plantas e sistemas variando de frascos de agitador em escala laboratorial a vasos de biorreator de vários milhares de litros e são de conhecimento geral na técnica da cultura de células de plantas. Vide, por exemplo, Fischer, R. *et al* (1999) e Doran, P. (2000). Depois das células de plantas transformadas terem sido cultivadas até a massa desejada, elas são colhidas, gentilmente lavadas e colocadas em um tampão adequado para disrupção. Muitos tampões diferentes são compatíveis com a presente invenção. Em geral o tampão é uma solução aquosa salina tamponada isotônica em ou próximo a um valor de pH neutro, com ou sem detergente para solubilizar proteínas ligadas à membrana. Preferencial tampões incluem Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco, PBS contendo 1 mM de EDTA, e MOPS (ácido 3-(N-Morfolino)propanossulfônico).

Em uma modalidade, células podem ser rompidas por sonicação. As células lavadas são colocadas em tampão em uma faixa de cerca de 0,01 mg/ml a cerca de 5,0 mg/ml, preferencialmente em uma faixa de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 0.5 mg/ml (lavadas células em peso por volume de tampão). Muitos instrumentos de sonicação disponíveis comercialmente são consistentes com a invenção e os tempos de sonicação variam a partir de cerca de 5 a cerca de 20 segundos, preferencialmente cerca de 15 a cerca de 20 segundos. Os fragmentos celulares resultantes podem variar de tamanho a partir de algumas micra até várias centenas de micra e expõem o polipeptídeo ou fragmentos imunogênicos do mesmo.

A presente invenção também refere-se a composições de vacinas de DNA que podem ser empregadas para provocar uma reação imune ou uma reação imune protetora. Neste aspecto da invenção, uma quantidade de uma composição compreendendo DNA recombinante ou mRNA codificando um polipeptídeo conforme proporcionado aqui, neste pedido de patente, (ou um fragmento do mesmo) é administrada a um indivíduo em uma quantidade suficiente para provocar uma reação imune ou reação imune pro-

tetora no referido indivíduo. Sequências de sinal podem ser deletadas do ácido nucleico codificando um antígeno de interesse e o indivíduo pode ser monitorado para a indução de uma reação imune de acordo com métodos conhecidos na técnica. Uma "reação imune protetora" ou "reação imune terapêutica" se refere a uma reação imune CTL (ou célula T CD8⁺), uma HTL (ou célula T CD4⁺), e/ou uma reação imune humoral protetora contra um antígeno que, de algum modo, previne ou no mínimo detém parcialmente sintomas de doença, efeitos colaterais ou progressão. No contexto desta invenção, uma reação protetora ou terapêutica semelhante proporciona aumento das taxas e sobrevida (reduzida mortalidade) em indivíduos imunizados comparados com indivíduos não imunizados ou uma redução na disseminação viral em indivíduos imunizados estimulados com o vírus West Nile.

Em outra modalidade, a presente invenção compreende adicionalmente a administração de vacinas de polinucleotídeos (DNA) em combinação com um antígeno de polipeptídeo, ou composição dos mesmos, da invenção. Em uma modalidade preferencial, o antígeno é o polipeptídeo que é codificado pelo polinucleotídeo administrado como a vacina de polinucleotídeo. Como uma modalidade particularmente preferencial, o antígeno de polipeptídeo é administrado como um reforço subsequente à administração inicial da vacina de polinucleotídeo.

Uma modalidade adicional da presente invenção proporciona a indução de uma reação imune aos novos antígenos do vírus West Nile revelados aqui, neste pedido de patente, (vide, por exemplo, os polipeptídeos e fragmentos de peptídeos determinados aqui, neste pedido de patente) usando um regime de vacinação "*prime-boost*" de conhecimento daqueles versados na técnica. Neste aspecto da invenção, uma vacina de DNA ou antígeno de polipeptídeo da presente invenção é administrada a um indivíduo em uma quantidade suficiente para "disparar" a reação imune do indivíduo. A reação imune do indivíduo é em seguida "reforçada" através da administração de: 1) um ou uma combinação de: um peptídeo, polipeptídeo, e/ou antígeno de polipeptídeo de extensão total da presente invenção (opcionalmente em combinação com uma molécula imunoestimulatória e/ou um

adjuvante); ou 2) um vetor viral que contém ácido nucleico codificando um, ou mais, dos mesmos constructos de antígeno ou, opcionalmente, diferentes, e/ou antígenos de peptídeos determinados aqui, neste pedido de patente. Em algumas modalidades alternativas da invenção, um gene codificando

5 uma molécula imunoestimulatória pode ser incorporada no vetor viral usado para "reforçar a reação imune do indivíduo. Moléculas imunoestimulatórias exemplares incluem, e não estão limitadas a, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, IL-24, eritropoietina, G-CSF, M-CSF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), MSF, li-

10 gante de FLT-3, EGF, fator de crescimento de fibroblasto (FGF; por exemplo, aFGF (FGF-1), bFGF (FGF-2), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, ou FGF-7), fatores de crescimento semelhantes à insulina (por exemplo, IGF-1, IGF-2); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); interferons (por exemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ); fator inibitório de leucemia (LIF); fator neurotrófico

15 ciliar (CNTF); oncostatina M; fator de células-tronco (SCF); fatores de crescimento transformar (por exemplo, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), ou quimocinas (tais como, mas não limitadas a, BCA-1/BLC-1, BRAK/Kec, CXCL16, CXCR3, ENA-78/LIX, Eotaxin-1, Eotaxin-2/MPIF-2, Exodus-2/SLC, Fractalkine/Neurotactin, GRO α /MGSA, HCC-1, I-TAC, Lymphotac-

20 tin/ATAC/SCM, MCP-1/MCAF, MCP-3, MCP-4, MDC/STCP-1, ABCD-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 α /GRO α , MIP-3 α /Exodus/LARC, MIP-3 β /Exodus-3/ELC, MIP-4/PARC/DC-CK1, PF-4, RANTES, SDF1 α , TARC, ou TECK). Genes codificando estas moléculas imunoestimulatórias são de conhecimento daqueles versados na técnica e sequências codificantes podem ser obtidas a

25 partir de uma variedade de fontes, incluindo vários bancos de dados de patentes, bancos de dados disponíveis publicamente (tais como os bancos de dados de ácidos nucleicos e proteínas encontrados na National Library of Medicine ou no European Molecular Biology Laboratory), a literatura científica, ou literatura científica citada em catálogos produzidos por empresas tais

30 como Genzyme, Inc., R&D Systems, Inc, ou InvivoGen, Inc. [vide, por exemplo, o catálogo de 1995 Cytokine Research Products, Genzyme Diagnostics, Genzyme Corporation, Cambridge MA; 2002 ou 1995 Catalog of R&D Sys-

tems, Inc (Minneapolis, MN); ou 2002 Catalog of InvivoGen, Inc (San Diego, CA) cada das quais é incorporada por meio de referência em sua totalidade, incluindo todas as referências citadas no mesmo].

5 Métodos para introduzir vacinas de DNA em indivíduos são de conhecimento geral do técnico versado. Por exemplo, DNA pode ser injetado no músculo esquelético ou outros tecidos somáticos (por exemplo, injeção intramuscular). Lipossomas catiônicos ou dispositivos biolísticos, tais como uma pistola genética, podem ser usados para liberar vacinas de DNA. Alternativamente, iontoforese e outros meios para transmissão transdérmica podem ser usados para a introdução de vacinas de DNA em um indivíduo.

Vetores virais para uso na presente invenção podem ter uma porção do genoma viral eliminado para introduzir novos genes sem destruir a infectividade do vírus. O vetor viral da presente invenção é, tipicamente, um vírus não-patogênico. A critério do profissional, o vetor viral pode ser selecionado de modo a infectar um tipo celular específico, tal como células apresentando antígeno competente (por exemplo, macrófago ou células dendríticas). Alternativamente, um vetor viral pode ser selecionado que é capaz de infectar qualquer célula no indivíduo. Vetores virais exemplares adequadas para uso na presente invenção incluem, mas não estão limitados a poxvírus tais como vírus de varíola bovina (*vaccinia*), avipox vírus, fowlpox vírus, um vírus de varíola bovina altamente atenuado (tal como Ankara ou MVA [*Vaccinia Ankara Modificado*]), retrovírus, adenovírus, baculovírus e semelhantes. Em uma modalidade preferencial, o vetor viral é Ankara ou MVA.

25 Estratégias gerais para construção de vetores de expressão do vírus de varíola bovina são conhecidos na técnica [vide, por exemplo, Smith e Moss, 1984; Patente dos Estados Unidos nº 4.738.846 (por este incorporada por meio de referência em sua totalidade)]. Sutter e Moss (1992) e Sutter *et al.* (1994) revelam a construção e uso como um vetor, um vírus Ankara recombinante não-replicante (MVA) o qual pode ser usado como um vetor viral na presente invenção.

30 Composições compreendendo os polinucleotídeos em questão podem incluir vetores de vacinas de ácidos nucleicos apropriados (plasmí-

deos), os quais estão disponíveis comercialmente (por exemplo, Vical, San Diego, CA) ou outros vetores de ácidos nucleicos (plasmídeos), os quais também estão disponíveis comercialmente (por exemplo, Valenti, Burlingame, CA). Alternativamente, composições compreendendo vetores virais e polinucleotídeos de acordo com a presente invenção também são proporcionadas pela presente invenção. Além disso, as composições podem incluir um veículo farmacêuticamente aceitável, por exemplo, salina. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis são de conhecimento geral na técnica e também estão disponíveis comercialmente. Por exemplo, os veículos aceitáveis referidos são descritos em E.W. Martin's *Remington's Pharmaceutical Science*, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios, e publicações referidos ou citados aqui, neste pedido de patente, são incorporados por meio de referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, na medida que não sejam inconsistentes com os explícitos ensinamentos nesta especificação.

Seguem-se exemplos os quais ilustram procedimentos para praticar a invenção. Estes exemplos não devem ser considerados como limitantes. Todas as percentagens são em peso e todas as proporções de misturas de solvente são em volume a menos que mencionado de modo diverso.

EXEMPLO 1 - OTIMIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO PARA EXPRESSÃO EM PLANTAS

Antecedentes

Para obter maiores níveis de expressão de um gene heterólogo em plantas, pode ser preferencial a reengenharia da sequência codificando proteína do gene de modo a ser expressado de modo mais eficaz em células de plantas. Tabaco é uma planta semelhante onde pode ser preferencial redesenhar a região codificante de proteína heteróloga antes da transformação para aumentar o nível de expressão do gene e o nível de proteína codificada na planta. Portanto, uma etapa adicional no desenho de um gene codificando uma proteína de vírus de mamífero é reengenharia de um gene heterólogo para expressão ótima.

Um motivo para a reengenharia de um gene codificando uma proteína de vírus de mamífero para expressão em tabaco é devido ao teor de G+C não-ótimo do gene de vírus mamífero nativo. Por exemplo, o baixo teor de G+C de muitos genes de vírus mamífero nativos (e consequente inclin-
5 clinando a direção do teor A+T alto) resulta na geração de sequência que mimicom ou duplicam as sequências de controle de gene de planta que são conhecidas por serem ricas altamente em A+T. A presença de algumas sequências ricas em A+T dentro do DNA de um ou mais genes introduzidos em plantas (por exemplo, regiões de TATA-box normalmente encontradas
10 em promotores genéticos) pode resultar em transcrição aberrante do um ou mais genes. Por outro lado, a presença de outras sequências regulatórias inerentes no mRNA transcrito (por exemplo, sequências de sinal de poliadenilação (AAUAAA), ou sequências complementares a pequenos RNAs nucleares envolvidos em unir pré-mRNA) pode levar a instabilidade de RNA.
15 Portanto, um objetivo no desenho de genes codificando uma proteína de vírus de mamífero para expressão de tabaco, mais preferencialmente referidos como um ou mais genes otimizados por planta, é gerar uma sequência de DNA tendo um teor de G+C próximo ao da média de regiões codificantes de gene de tabaco. Outro objetivo no desenho do um ou mais genes otimizados por planta codificando uma proteína de vírus de mamífero é gerar
20 uma sequência de DNA na qual as modificações das sequências não impedem translação.

O teor de G+C das regiões codificantes de 1343 genes de tabaco é calculado como sendo de 43,6%. Portanto é preferencial, ao desenhar
25 um gene heterólogo codificando uma proteína de vírus de mamífero, atingir um teor de G+C próximo a cerca de 44%.

Devido à plasticidade proporcionada pela redundância / degeneração do código genético (isto é, alguns aminoácidos são especificados por mais de um códon), a evolução dos genomas em diferentes organismos ou
30 classes de organismos resultou em uso diferencial de códons redundantes. Esta "propensão de códons" é refletida na composição de bases média de regiões codificantes de proteína. Por exemplo, organismos com teores de

G+C relativamente baixos utilizam códons tendo A ou T na terceira posição de códons redundantes, ao passo que aqueles tendo maiores teores de G+C utilizam códons tendo G ou C na terceira posição de códons. Imagina-se que a presença de códons "menores" dentro de um mRNA pode reduzir a taxa de translação absoluta daquele mRNA, especialmente quando a relativa abundância do tRNA carregado correspondente ao menor códon é baixa. Uma extensão deste conceito é que a diminuição da taxa de translação por códons menores individuais seria no mínimo aditivo para múltiplos códons menores. Portanto, mRNAs tendo teores altos relativos de códons menores teriam taxas de translação correspondentemente baixas. Esta taxa seria refletida por baixos níveis subsequentes da proteína codificada.

Para ajudar na produção de genes codificando uma proteína de vírus de mamífero para expressão em tabaco (ou em outra planta, tal como algodão, milho, ou soja), pode ser determinada a propensão de códons de genes de tabaco (ou outros genes de plantas relevantes). A propensão de códons para regiões codificantes de proteína genética de tabaco é representada pela distribuição de códons estatística que a planta usa para codificar suas proteínas, e é mostrada na Tabela 1, expressada como a frequência (em percentagens) com a qual cada códon especificando um único aminoácido é usado para codificar o aminoácido. Os códons mais preferenciais pela planta são determinados, bem como a segunda, terceira, ou quarta escolhas de códons preferenciais quando existem múltiplas escolhas. Uma nova sequência de DNA pode ser então designada a qual codifica a sequência de aminoácidos da proteína de vírus de mamífero, mas a nova sequência de DNA difere da sequência de DNA ou RNA de vírus de mamífero nativo (codificando a proteína) pela substituição dos códons (primeiro preferencial, segundo preferencial, terceiro preferencial, ou quarto preferencial) da planta para especificar o aminoácido apropriado em cada posição dentro da sequência de aminoácidos da proteína. A nova sequência pode ser então analisada para sítios de reconhecimento de enzimas de restrição que podem ter sido criadas pelas modificações. Os sítios identificados são adicionalmente modificados substituindo os códons relevantes com primeira, segunda, ter-

ceira, ou quarta escolha de códons preferenciais. Outros sítios na sequência os quais podem afetar transcrição ou translação do gene de interesse incluem as junções éxon:íntron (5' ou 3'), sinais de poli A adição, ou sinais de terminação de RNA polimerase. A sequência modificada é adicionalmente analisada e adicionalmente modificada para reduzir a frequência de dubletos TA ou CG, e para aumentar a frequência de dubletos TG ou CT. Além destes dubletos, blocos de sequências que têm mais de cerca de cinco resíduos consecutivos de [G+C] ou [A+T] podem afetar a transcrição ou translação da sequência. Portanto, estes blocos de sequências também são modificados substituindo os códons de primeira ou segunda escolha, e etc. com outros códons preferenciais de escolha. Códons raramente usados não são incluídos em uma extensão substancial no design genético, sendo usados somente quando necessário para conciliar um critério de design diferente da composição de códon *per se* (por exemplo, adição ou eliminação de sítios de reconhecimento de enzimas de restrição).

O método descrito acima permite a uma pessoa versada na técnica desenhar um ou mais genes modificados que são estranhos para uma planta em particular de modo que os genes são otimamente expressados em plantas. O método é adicionalmente descrito e ilustrado na Patente dos Estados Unidos Número 5.380.831 e no pedido de patente internacional WO Nº 97/13402.

Portanto, de modo a desenhar genes otimizados de plantas codificando uma proteína de vírus de mamífero, uma sequência de DNA é desenhada para codificar a sequência de aminoácidos da referida proteína utilizando um código genético redundante estabelecido a partir de uma tabela de propensão de códons compilada a partir das sequências genéticas para a planta ou plantas em particular. A sequência de DNA resultante tem um maior grau de diversidade de códons, uma composição de base desejável, pode conter sítios de reconhecimento de enzima de restrição dispostos estrategicamente, e carece de sequências que podem interferir com transcrição do gene, ou translação do mRNA do produto. Portanto, genes sintéticos que são funcionalmente equivalentes para as proteínas / genes da presente in-

venção podem ser usados para transformar hospedeiros, inclusive plantas. Orientação adicional referente à produção de genes sintéticos pode ser encontrada, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos nº 5.380.831.

5 Uma vez que a referida sequência de DNA tenha sido desenhada sobre papel ou *in silico*, moléculas de DNA reais podem ser sintetizadas no laboratório para corresponder em sequência precisamente à sequência designada. As moléculas de DNA sintético referidas podem ser clonadas e manipuladas de modo diverso exatamente como se fossem derivadas de fontes naturais ou nativas.

10 Desenho de regiões codificantes com propensão para tabaco para peptídeos prM-M-E de WNV.

Toda a sequência genômica de um isolado de flamingo do Vírus West Nile é revelada como GenBank Acesso nº AF196835. A sequência de DNA de 2004 pares de bases (pb) da porção do genoma viral nativo que co-

15 difica os peptídeos prM, M e E do vírus são representadas na SEQ ID NO: 1 pelos nucleotídeos 1-276 (peptídeo prM), 277-501 (peptídeo M), e 502-2004 (peptídeo E) [A SEQ ID NO: 1 compreende as bases 466 a 2469 de AF196835]. Para os fins deste exemplo, a sequência de nucleotídeos nativa será referida como Versão 1. As sequências de aminoácidos dos peptídeos

20 prM, M e E codificadas por SEQ ID NO: 1 são apresentadas como SEQ ID NO: 2. O exame da sequência de DNA genômica nativa de SEQ ID NO: 1 revelou a presença de vários motivos de sequências que se considera que sejam prejudiciais para expressão de planta ótima, bem como uma composição de códon não-ótima para expressão em tabaco. Para melhorar a pro-

25 dução destas proteínas recombinantes em tabaco, foi desenvolvida uma sequência de DNA "otimizada por tabaco" (SEQ ID NO: 3) que codifica os peptídeos prM, M, e E de SEQ ID NO: 2

Os peptídeos prM, M, e E (SEQ ID NO: 2) codificados pela sequência da região codificante nativa em SEQ ID NO: 1 e pela região codifi-

30 cante otimizada por tabaco em SEQ ID NO: 3 são idênticos. Em contraste, a sequência de DNA viral nativa e a sequência de DNA otimizada por tabaco codificando os peptídeos prM, M e E são somente 78,7% idênticas.

Desenho de regiões codificantes com propensão para tabaco para peptídeos prM-M-E de WNV com sítio de N-glicosilação modificado.

É conhecido dentro do campo da bioquímica de proteínas vegetais que vários açúcares ou oligossacarídeos podem ser fixados a moléculas de proteína (o processo referido sendo referido coletivamente como glicosilação), e que a composição e a apresentação de semelhantes porções de açúcar podem afetar a antigenicidade da proteína quando introduzida em mamíferos. É adicionalmente conhecido que as sequências de aminoácido curtas Asparagina-Xaa-Serina, e Asparagina-Xaa-Treonina (abreviadas como Asn-Xaa-Ser/Thr ou N-X-S/T, onde Xaa e X representam quaisquer dos 20 aminoácidos normalmente encontrados em proteínas) podem servir como sítios aceptores para ligações de glicosilação nas proteínas, em que os açúcares são fixados ao resíduo Asn (N). A sequência aceitadora de N-glicosilação Asn-Tyr-Ser é encontrada como aminoácidos 321 a 323 na SEQ ID NO: 2, e é um sítio de N-glicosilação conhecido para o peptídeo E. A SEQ ID NO: 4 revela uma sequência de DNA otimizada por tabaco codificando os peptídeos prM, M e E, em que a sequência de DNA codificando a sequência aceitadora de N-glicosilação Asn-Tyr-Ser do peptídeo E nativo foi mutada para codificar Asn-Tyr-Pro. Portanto, a única diferença entre a SEQ ID NO: 3 e a SEQ ID NO: 4 é a substituição de um códon CCA prolina pelo códon AGC Serina nas bases 967 a 969. A sequência de aminoácidos da proteína mutada, carecendo da sequência aceitadora de N-glicosilação, e codificada pela SEQ ID NO: 4, é revelada como SEQ ID NO: 5.

Região codificante de peptídeos M e E de WNV com propensão para tabaco
Versão 2.

Para algumas utilidades, é desejável utilizar uma sequência de DNA que codifica somente os peptídeos M e E do Vírus West Nile. Para expressão em células de tabaco, é suficiente usar a porção de SEQ ID NO: 3 que codifica estes peptídeos (isto é, bases 277-2004 de SEQ ID NO: 3). Portanto, a sequência de uma região codificante com propensão para tabaco codificando os peptídeos M e E de WNV é apresentada como SEQ ID NO: 6. Esta sequência codifica os resíduos 93-668 de SEQ ID NO: 2. A sequência

de DNA viral nativa codificando os peptídeos M e E (bases 277-2004 de SEQ ID NO: 1) e a sequência de DNA otimizada por tabaco de SEQ ID NO: 6, a qual também codifica os peptídeos M e E, são somente 78,4% idênticas, enquanto as proteínas codificadas são 100% idênticas.

5 Desenho de região codificante de peptídeos M e E de WNV com propensão para tabaco Versão 3.

Frequentemente é desejável e vantajoso introduzir mais de uma única cópia de um gene codificando uma proteína em uma célula de planta de modo a produzir maiores níveis da proteína desejada. As cópias separadas da região codificante de proteína podem ser introduzidas com cada cópia sob os controles de expressão de promotores separados e elementos de controle transcricionais associados, ou podem ser introduzidas como uma unidade sob o controle de expressão de um único promotor de planta bidirecional. Em qualquer caso é desejável e vantajoso que as regiões codificantes de proteína separadas tenham sequências de DNA não-idênticas. Há duas ou mais razões biológicas porque isto é assim. Primeiro, é conhecido que grandes sequências de DNA duplicadas são instáveis em muitas cepas bacterianas usadas como hospedeiros de clonagem molecular (por exemplo, *Escherichia coli*) ou em transformação de planta (*Agrobacterium tumefaciens*). Portanto, a provisão de regiões codificantes não-idênticas especificando proteínas idênticas reduz a oportunidade de redistribuições prejudiciais e/ou eliminações ocorrerem durante estas manipulações. Segundo, imagina-se que a expressão de regiões codificantes altamente homólogas duplicadas em plantas transgênicas pode sofrer através de mecanismos tais como silenciamento genético. A introdução de regiões codificantes não-idênticas especificando proteínas idênticas portanto proporciona maior oportunidade para maiores níveis de produção de proteína (e mais estável).

Usando os fundamentos resumidos acima, uma segunda região codificante otimizada por tabaco para os peptídeos M e E de WNV foi designada e é revelada como SEQ ID NO: 7. É enfatizado que a proteína codificada por SEQ ID NO: 7 é idêntica à codificada por bases 277-2004 da sequência nativa de SEQ ID NO: 1 (isto é, resíduos 93-668 de SEQ ID NO: 2),

e a qual é também codificada pela versão prévia otimizada por tabaco revelada na SEQ ID NO: 6. Comparações da segunda sequência otimizada por tabaco revelada na SEQ ID NO: 7 com bases 277-2004 da sequência nativa em SEQ ID NO: 1, e com a primeira versão otimizada por tabaco em SEQ ID. NO: 6, revela que é 74,6 % idêntica à sequência de WNV nativa correspondente, e 69,4 % idêntica à primeira versão otimizada por tabaco. Portanto, é evidente que pode-se gerar diversidade de sequência de DNA substancial entre diferentes designs de região codificante otimizada por planta, enquanto ainda permanecendo dentro dos limites da sequência de aminoácidos da proteína codificada, composição de códons global, e a ausência de sequências que podem ser prejudiciais para expressão genética em planta. Esta característica da invenção é ilustrada na Tabela 2, a qual apresenta as composições de códons diferenciais das três sequências de DNA reveladas.

Modificações adicionais das regiões codificantes dos peptídeos prM, M e E de WNV otimizados por tabaco.

É de conhecimento daqueles versados no campo da expressão genética de plantas transgênicas que os níveis de acreção de proteínas heterólogas são dependentes de muitas variáveis, uma das quais é a localização intracelular para a qual a proteína é dirigida durante ou depois de translação. Além disso, é adicionalmente conhecido que a translocação de uma proteína heteróloga para o retículo endoplasmático (ER) pode ter um efeito positivo sobre a acumulação da proteína, e que uma proteína heteróloga pode ser dirigida para acumulação dentro do retículo endoplasmático pela adição de um peptídeo tendo por alvo retículo endoplasmático curto ao término amino da proteína. As proteínas zeína de 15 quiloDalton (kDa) de milho possuem um peptídeo tendo por alvo ER semelhante, e foi demonstrado que a fixação de um peptídeo tendo por alvo ER zeína de 15 kDa ao término amino de uma proteína heteróloga pode resultar no tráfico da proteína para o ER de células monocotiledôneas bem como células dicotiledôneas. O método mais direto por meio do qual fixar o peptídeo tendo por alvo ER ao término amino de uma proteína heteróloga é construir uma região codificante de proteína que codifica ambos os elementos (o peptídeo tendo por alvo ER e a

região codificante de proteína) em uma única estrutura de leitura aberta a qual quando traduzida gera uma proteína de fusão (quimérica) contendo ambos os domínios. É adicionalmente conhecido por aqueles versados no campo que algumas sequências de peptídeo curtas, quando presentes no

5 término carbóxi de proteínas localizadas no retículo endoplasmático, podem ditar a retenção das proteínas dentro do retículo endoplasmático, deste modo proporcionando acumulação de proteína eficaz e glicosilação dentro do retículo endoplasmático. Um peptídeo de sinal de retenção do ER semelhante é a sequência de aminoácidos Lisina-Ácido Aspártico-Ácido Glutâmico-

10 Leucina (abreviada como KDEL). Portanto, pode-se facilitar a translocação de uma proteína heteróloga para o retículo endoplasmático e sua retenção dentro do retículo endoplasmático construindo uma única estrutura de leitura aberta que codifica todos os três elementos (a sequência do peptídeo tendo por alvo ER, a sequência da região codificante de proteína heteróloga, e a

15 sequência de sinal de retenção do ER), e a qual quando traduzida produz uma proteína de fusão (quimérica) que contém todos os três domínios na ordem listada do término amino ao término carbóxi.

Também é de conhecimento geral daqueles no campo da expressão de transgene em plantas que alguns elementos de sequências de

20 nucleotídeos flanqueando (ou incluídos dentro de) uma região codificante para uma proteína heteróloga pode afetar a translação do RNA mensageiro (mRNA) codificando a proteína heteróloga. Um elemento de sequência semelhante que afeta a translação do mRNA é a sequência de nucleotídeos em torno do códon de iniciação de translação AUG (ATG no código de

25 DNA). Em plantas dicotiledônea, incluindo tabaco, é conhecido que um contexto de sequência de início de translação ótima inclui os nucleotídeos GC imediatamente depois do ATG. No código genético universal, GCN representa códons especificando Alanina. Portanto, um contexto de códon de iniciação translacional ótimo é especificado como ATGGCN (codificando Metioni-

30 na-Alanina). É adicionalmente conhecido que um contexto de sequência ótima precedendo o códon de iniciação translacional ATG em mRNAs de dicot é representado por AAACA. Finalmente, é essencial que a estrutura de leitu-

ra aberta codificando uma proteína seja terminado com no mínimo um códon de terminação translacional (isto é, TGA, TAA ou TAG no código genético de DNA universal), e ainda mais preferencial que múltiplos códons de terminação translação estejam presentes em não somente o mesmo estrutura de
 5 leitura que a região codificante de proteína (denominado o estrutura +1), mas também nos outros cinco estruturas de leitura possíveis em DNA de filamento duplo.

A SEQ ID NO: 8 revela a sequência de DNA de uma região codificante de proteína quimérica otimizada por tabaco completa que incorpora
 10 os elementos mencionados acima, compreendendo uma sequência otimizada por tabaco codificando o peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, uma região codificante de peptídeos prM. M e E otimizada por tabaco (revelada como SEQ ID NO: 3), e um sinal de retenção do ER KDEL otimizado por tabaco. A proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 8
 15 é revelada como SEQ ID NO: 9. O sinal tendo por alvo ER codificado por SEQ ID NO: 8 e apresentado na SEQ ID NO: 9 difere da sequência de peptídeo tendo por alvo ER zeína de 15 kDa de milho nativa pela adição de um resíduo Alanina na posição nº 2, para conciliar o contexto da sequência de códon de iniciação translacional de consenso descrita acima.

20 A SEQ ID NO: 10 revela a sequência de DNA de uma segunda região codificante de proteína quimérica otimizada por tabaco completa que incorpora os elementos mencionados acima, compreendendo uma sequência otimizada por tabaco codificando o peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, uma região codificante de peptídeos prM. M e E otimizada
 25 por tabaco incluindo um sítio aceptor de N-glicosilação mutado conforme revelado na SEQ ID NO: 4, e um sinal de retenção do ER KDEL otimizado por tabaco. O sinal tendo por alvo ER codificado por SEQ ID NO: 10 é o mesmo que o revelado na SEQ ID NO: 8. A proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 10 é revelada como SEQ ID NO: 11

30 A SEQ ID NO: 12 revela a sequência de DNA de uma terceira região codificante de proteína quimérica otimizada por tabaco completa que incorpora os elementos mencionados acima, compreendendo uma sequên-

cia otimizada por tabaco codificando o peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, uma região codificante de peptídeos M e E otimizada por tabaco conforme revelado na SEQ ID NO: 6, e um sinal de retenção do ER KDEL otimizado por tabaco. O sinal tendo por alvo ER codificado por SEQ ID NO: 12 é o mesmo que o revelado na SEQ ID NO: 8. A proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 12 é revelada como SEQ ID NO: 13.

A SEQ ID NO: 14 revela a sequência de DNA de uma quarta região codificante de proteína quimérica otimizada por tabaco completa que incorpora os elementos mencionados acima, compreendendo uma sequência otimizada por tabaco codificando o peptídeo de sinal tendo por alvo ER zeína de 15 kDa, uma região codificante de peptídeos M e E otimizada por tabaco conforme revelado na SEQ ID NO: 7, e um sinal de retenção do ER KDEL otimizado por tabaco. O sinal tendo por alvo ER codificado por SEQ ID NO: 14 é o mesmo que o revelado na SEQ ID NO: 8. A proteína de fusão quimérica codificada por SEQ ID NO: 14 é revelada como SEQ ID NO: 15.

Moléculas de DNA compreendendo as sequências de DNA reveladas na SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, e SEQ ID NO: 14 foram sintetizadas por um vendedor comercial (PicoScript; Houston, Texas) e as moléculas resultantes foram clonadas em vetores de expressão em planta e de transformação por técnicas biológicas moleculares de rotina.

EXEMPLO 2 - CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTA **Constructos Binários de Dicot.**

Três vetores binários de dicot, pDAB2475, pDAB2478, e pDAB2481, para transformação vegetal mediada por *Agrobacterium* foram construídos com base nos plasmídeos pDAB2406, pDAB2418, e pDAB2407. pDAB2406 (Figura 1) contém o promotor do vírus do mosaico da veia da mandioca (CsVMV) descrito na publicação de patente internacional WO Nº 97/48819 e uma região não traduzida 3' de estrutura de leitura aberta, ORF23 3'UTR (GenBank número de acesso X00493) v1. Localizados entre o promotor CsVMV e ORF23 3'UTR v1 estão sítios únicos, NcoI e SacI, os quais foram usados para inserir o gene de interesse. pDAB2418 (Figura 2) contém a região de fixação de matriz RB7 (MAR) (Patente dos Estados Uni-

dos nº 5.773.689; Patente dos Estados Unidos nº 5.773.695; Patente dos Estados Unidos nº 6.239.328, publicação de patente internacional WO Nº 94/07902, e publicação de patente internacional WO Nº 97/27207) e a unidade de transcrição vegetal onde o marcador de seleção vegetal fosfinotricina acetil transferase (PAT) (Patentes dos Estados Unidos Nos.: 5.879.903; 5.637.489; 5.276.268; e 5.273.894) é dirigida pelo promotor AtUbi10 (Sun C.-W. *et al.*, 1997; Norris, S.R. *et al.*, 1993; Callis, J. *et al.*, 1995) e flanqueada, a jusante pela AtuORF1 3' UTR v3 (US5428147; Barker, R.F., *et al.*, 1983; GenBank número de acesso X00493). Um único sítio NotI, localizado entre o gene RB7 MAR e o promotor AtUbi10 vegetal, foi usado para clonar fragmentos genéticos de pDAB2406 contendo o promotor CsVMV, gene de interesse, e ORF23 3'UTR v1.

Um vetor binário básico modificado, pDAB2407 (Figura 3), foi construído adicionando um ligante Agel no único sítio BamHI de pBBV permitindo a ligação Agel/Agel do antígeno de WNV e cassetes de expressão de marcadores selecionáveis entre as bordas de T-DNA.

O vetor binário de dicot do Vírus West Nile, pDAB2475 (Figura 4), codifica uma proteína quimérica consistindo em peptídeo de membrana e de envelope do Vírus West Nile com propensão para códon de tabaco (versão 2) com ER tendo por alvo v2 e sinais de retenção KDEL v3 (SEQ ID NO 12). Mais especificamente, a unidade de transcrição vegetal (PTU) inclui: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / zeína de 15 kDa ER sinal v2 – WNV ME v2 - KDEL v3 / Atu ORF23 3'UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / AtuORF1 3' UTR v3 / T-DNA Borda A. Conforme obtido de PicoScript no vetor Bluescript da Stratagene, o constructo primário foi designado como DASPICO20. Para isolar o gene de sinal de ER de 15 kDa v2-WNV ME v2-KDEL v3 de seu vetor da espinha dorsal Bluescript, DASPICO20 foi digerido com NcoI/SacI e foi em seguida inserido em plasmídeo pDAB2406 nos sítios NcoI e por T4 ligase, onde o fragmento genético foi intercalado entre o CsVMV promotor v2 e a ORF23 3' UTR v1, resultando no vetor intermediário pDAB2473. Para verificar um clone com o inserto adequado, DNA isolado foi cortado com NcoI/SacI, identificado por eletroforese

por gel, e aumentado. O promotor do cassete de expressão CsVMV contendo sinal de ER-WNV ME v2-KDEL e ORF23 3'UTR foi removido de pDAB2473 com NotI e foi ligado por T4 no sítio NotI de pDAB2418, a jusante do RB7 MARv3 e a montante dos cassetes de marcadores selecionáveis

5 AtUbi10 promotor v2-PAT v3-AtuORF1 3'UTR formando as unidades de transcrição vegetal (PTU) no vetor intermediário pDAB2474. Os componentes da PTU foram então excisados de pDAB2474 usando digestão por AgeI e ligados em orientação reversa no sítio AgeI de pDAB2407, o que resultou no vetor binário de dicot final, pDAB2475, onde os elementos PTU são flan-

10 queados por T-DNA bordas A e B.

O vetor binário de dicot, pDAB2478 (Figura 5), codifica uma proteína quimérica consistindo nos peptídeos do Vírus West Nile com propensão para códon de tabaco pré-membrana v2, de membrana e de envelope v2 com ER tendo por alvo v2 e sinais de retenção KDEL v3 (SEQ ID NO 8).

15 Mais especificamente, os dois PTU incluem: T-DNA Borda B/RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / zeína de 15 kDa ER sinal v2 – prMEv2 – KDEL v3 / Atu ORF23 3'UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / AtuORF1 3' UTR v3 / T-DNA Borda A. Conforme obtida do PICOSCRIPT em vetor Bluescript da Stratagene, o constructo primário foi designado como DASPICO21. Para

20 isolar o gene de sinal de ER v2-prME v2-KDEL v3 de seu vetor da espinha dorsal, DASPICO21 foi digerido com NcoI/ SacI. O fragmento genético de sinal de ER v2-prME v2-KDEL v3 foi em seguida ligado por T4 em plasmídeo pDAB2406 nos sítios NcoI e SacI onde o fragmento genético foi flanqueado pelo promotor CsVMV e ORF23 3' UTR resultando no vetor intermediário

25 pDAB2476. Para verificar um clone com inserto adequado, DNA isolado foi cortado com NcoI/SacI, identificado por eletroforese por gel, e aumentado. O promotor do cassete de expressão CsVMV contendo sinal de ER v2- prME v2-KDEL v3 e ORF23 3'UTR foi removido de pDAB2476 com NotI e ligado usando T4 ligase no sítio NotI de pDAB2418, a jusante do gene RB7 MARv3

30 e a montante do cassete de marcadores selecionáveis de AtUbi10 promotor v2-PAT v3-AtuORF1 3'UTR formando as unidades de transcrição vegetal (PTU) do constructo intermediário pDAB2477. Os componentes da PTU fo-

ram em seguida excisados de pDAB2477 com Agel, purificados por gel, e ligados em orientação reversa no sítio Agel de pDAB2407, o que resultou no vetor de dicot final, pDAB2478, onde os componentes da PTU são flanqueados por T-DNA bordas A e B.

5 O vetor binário de dicot, pDAB2481 (Figura 6), codifica uma proteína quimérica consistindo nos peptídeos do Vírus West Nile com propensão para códon do tabaco pré-membrana v2, de membrana v2, e de envelope com um sítio de N-glicosilação mutado (versão 4) com ER tendo por alvo sinais de retenção v2 e KDEL v3 (SEQ ID NO 10). Mais especificamente, as

10 unidades PTU incluem: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / zeína de 15 kDa de sinal de ER v2- WNV prM v2 E v4 com sítio de N-glicosilação mutado - KDEL v3 / Atu ORF23 3'UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / AtuORF1 3' UTR v3 / T-DNA Borda A. Conforme obtido de PICOSCRIPIT em vetor Bluescript da Stratagene, o constructo primário foi designado como DASPICO22. Para isolar o gene de sinal de ER v2 -WNV prM

15 v2 E v4 com sítio de N-glicosilação mutado-KDEL v3 de seu vetor da espinha dorsal, DASPICO22 foi digerido com NcoI/ SacI e purificado por gel. O fragmento genético de sinal de ER v2-WNV prM v2 E v4 com sítio de N-glicosilação mutado -KDEL v3 foi em seguida inserido por T4 ligase em

20 plasmídeo pDAB2406 nos sítios NcoI e SacI, onde o fragmento genético foi intercalado entre o CsVMV promotor v2 e a ORF23 3' UTR v1 resultando no vetor intermediário pDAB2479. Para verificar um clone com inserto, DNA isolado foi cortado com NcoI/SacI, identificado por eletroforese por gel, e aumentado. O promotor do cassete de expressão CsVMV contendo sinal de

25 ER v2-WNV prM v2 E v4 com sítio de N-glicosilação mutado -KDEL v3 e ORF23 3'UTR foi removido de pDAB2479 com NotI e foi ligado no sítio NotI de pDAB2418, a jusante do gene RB7 MARv3 e a montante do cassete de marcadores selecionáveis de AtUbi10 promotor v2-PAT v3-AtuORF1 3'UTR formando os componentes da PTU do constructo intermediário pDAB2480.

30 As unidades PTU foram então excisadas de pDAB2480 com Agel, purificadas por gel, e ligadas em orientação reversa no sítio Agel de pDAB2407, o que resultou no vetor de dicot final, pDAB2481, onde o cassete PTU é flan-

queado por T-DNA bordas A e B. Todos os constructos finais foram verificados inicialmente por digestão de restrição, seguidos por sequenciamento entre as bordas de T-DNA, o que confirmou que a sequência real e esperada eram idênticas.

5 Constructos Binários de Dicot Gateway®.

Gateway® Technology (Invitrogen) foi usada para clonar os nove vetores binários de dicot de WNV ME seguintes, os quais contêm múltiplas versões de peptídeo ME, promotores, e orientação do gene de interesse em relação ao promotor e UTR. Tanto os vetores de destinação quanto doadores foram preparados seguindo o protocolo Gateway® Technology da Invitrogen. Um vetor de destinação, pDAB3736 (Figura 7), e quatro vetores doadores, pDAB3912 (Figura 8), pDAB3914 (Figura 9), pDAB3916 (Figura 10), e pDAB3724 (Figura 11) compuseram a espinha dorsal dos constructos Gateway® usados para construir estes nove constructos binários.

O vetor de destinação pDAB3736 foi derivado de pDAB2407 (Figura 3) e contém sítios attR os quais recombina com um clone de entrada em uma reação de LR clonase para gerar um clone de expressão. Adicionalmente, pDAB3736 tem múltiplas cópias de T-DNA Borda A. Dentro das regiões de Borda A e Borda B, há uma região de fixação de matriz RB7 (MAR) e sítios de clonagem Gateway® attR1 e attR2. O vetor de entrada pDAB3912 (Figura 8) contém o promotor CsVMV e o cassete ORF23 3'UTR. Localizados entre o promotor e UTR estão sítios NcoI e SacI onde o gene de interesse foi inserido. O cassete é flanqueado por sítios de clonagem Gateway® attL1 e attL2 para geração de clones de entrada. Outro vetor de entrada, pDAB3914 (Figura 9), contém o promotor Δ MAS 4OCS (promotor AtUbi10) v4 (Genbank número de acesso X00493) e o cassete ORF23 3'UTR. Novamente, entre o promotor e UTR estão sítios de clonagem, NcoI e SacI, onde o gene de interesse foi inserido. O cassete é flanqueado por sítios Gateway® attL1 e attL2. Como os outros vetores doadores, pDAB3916 (Figura 10) é um constructo Gateway® o qual contém promotor AtUbi10 e cassete ORF23 3'UTR. Entre o promotor e UTR estão sítios NcoI e SacI, onde o gene de interesse foi inserido. O cassete é flanqueado por sítios de clonagem

Gateway® attL1 e attL2. O vetor doador Gateway, pDAB3724 (Figura 11), contém o promotor CsVMV seguido sequencialmente por Nt Osmotin 5' UTR v3 (Genbank número de acesso S40046), gene reporter de β -Glucuronidase (GUS) (Jefferson, 1987), e Nt Osm 3' UTR v3 (Genbank número de acesso S40046). Estes elementos são flanqueados por sítios Gateway® attL1 e attL2. Sítios de restrição, NcoI e SacI, limitando o gene GUS foram usados para substituir GUS com o gene de interesse.

Vetor binário Gateway® WNV ME, pDAB3920 (Figura 12), contém as unidades PTU: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / WNV ME v2 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. Amplificação do peptídeo de WNV ME v2 foi realizada por reação de cadeia polimerase (PCR). As sequências ER v2 tendo por alvo e de retenção KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foram removidas do peptídeo ME usando iniciadores de PCR (dianteiro: 5' aga gaa cta gta aaa agg aga aat cca tgg ctt ccc tga cag tgc aaa ctc atg 3'; Reverso: 5' Ccc tcg agg gag ctc tta tca ctt agc atg aac att tac ag 3') que iniciou somente para a sequência de WNV ME v2 e consistiram de um sítio NcoI no iniciador dianteiro e um sítio SacI no iniciador reverso. O produto de PCR WNV ME v2 foi clonado diretamente no vetor pCR2.1 TOPO usando o protocolo de clonagem da Invitrogen TOPO TA para formar pDAB3918. O gene WNV ME v2 foi em seguida isolado usando digestão por NcoI e SacI da espinha dorsal TOPO e ligado usando T4 ligase no sítio NcoI/SacI de pDAB3912 para formar o clone de entrada, pDAB3919. pDAB3919 foi reagido com LR Clonase em pDAB3736 para formar pDAB3920.

Vetor binário Gateway®, pDAB3922 (Figura 13), contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / AtuMAS 4OCS promotor v4 / zeína de 15 kDa ER v2-WNV ME v2-KDELv3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. O peptídeo de sinal de ER v2-ME v2-KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foi removido de seu plasmídeo da espinha dorsal com NcoI e SacI. O fragmento genético excisado foi em seguida inserido no sítio NcoI/SacI de

pDAB3914 para formar clone de entrada, pDAB3921, com o gene de interesse intercalado entre o AtuMAS 4OCS promotor v4 e ORF23 3' UTR v1. pDAB3921 foi em seguida reagido com LR Clonase no vetor de destinação pDAB3736 para formar o vetor de expressão e binário, pDAB3922.

5 Vetor binário Gateway® do Vírus West Nile, pDAB3924 (Figura 14), contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / At Ubi10 promotor (Genbank Acesso nº L05363) v2 / zeína de 15 kDa ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. O peptídeo de sinal de
10 ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foi removido de seu plasmídeo da espinha dorsal com NcoI e SacI. O fragmento genético excisado foi em seguida inserido no sítio NcoI/SacI de pDAB3916 para formar clone de entrada, pDAB3923, com o gene de interesse ensanduichado entre o promotor At Ubi10 v2 e ORF23 3' UTR v1. pDAB3923 foi em seguida
15 reagido com LR Clonase com vetor de destinação pDAB3736 para formar vetor binário de dicot, pDAB3924.

 Vetor binário Gateway®, pDAB3927 (Figura 15), contém os seguintes elementos PTU: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / zeína de 15 kDa de sinal de ER v2-WNV ME v2 / Atu ORF23 3' UTR v1 /
20 AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. Amplificação do peptídeo de sinal de ER v2-WNV ME v2 foi realizada por PCR. A sequência de retenção de KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foi removida do peptídeo ME v2 usando iniciadores de PCR (dianteiro: 5' cat gcc atg gct aag atg gtc att gtg ctt gtt gtg tgc 3'; Reverso: 5' ccc tcg agg gag
25 ctc tta tca ctt agc atg aac att tac ag 3') que iniciou somente para a sequência de sinal de ER v2-WNV ME v2 e consistiram em um sítio NcoI no iniciador forward e um sítio SacI no iniciador reverso para fins de clonagem. O produto de PCR de sinal de ER v2-WNV ME v2 foi clonado diretamente no vetor pCR2.1 TOPO usando o protocolo de clonagem da Invitrogen TOPO TA para formar pDAB3925. O gene de sinal de ER v2-WNV ME v2 foi em seguida
30 isolado usando NcoI e SacI de seu plasmídeo da espinha dorsal TOPO e foi ligado usando T4 ligase no sítio NcoI/SacI de pDAB3912 para formar o clone

de entrada, pDAB3926. pDAB3926 foi reagido com LR Clonase com vetor de destinação, pDAB3736, para formar o vetor binário final pDAB3927.

Vetor binário Gateway®, pDAB3929 (Figura 16), contém as seguintes unidades PTU: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / Nt osm 5' UTR v3 / zeína de 15 kDa de ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 / Nt osm 3' UTR v3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. O peptídeo de sinal de ER v2-ME v2-KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foi removido de seu plasmídeo da espinha dorsal com NcoI e SacI. O gene fragmento excisado foi em seguida inserido no sítio NcoI/SacI de pDAB3724 (Figura 11) usando T4 ligase para formar clone de entrada, pDAB3928, com o gene de interesse intercalado entre o CsVMV/Nt osm 5' UTR e Nt osm 3' UTR v3/ORF23 3'UTR. Reação de LR clonase com pDAB3928 e vetor de destinação pDAB3736 resultou na produção do vetor binário, pDAB3929.

Vetor binário Gateway®, pDAB3934 (Figura 17), contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / ORF25 / 26 3'UTR / KDELv3 / WNV ME v3 / zeína de 15 kDa ER signal v2 (SEQ ID NO 14) / AtMAS 4OCS promotor v4 / 15kD zeína de sinal de ER v2- WNV ME v2-KDELv3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. Para geração deste constructo, um processo de clonagem de múltiplas etapas incluiu amplificação do ORF 25/26 poli A UTR a partir do constructo p501 (Murai e Kemp, 1982) usando iniciadores (dianteiro: 5' ccc aag ctt ggg tgt cca aca gtc tca ggg tta atg tc 3'; Reverso: ccca agct tgg g tgg cac gtg agg tcc atg cgg ctg c) que continham sítios HindIII flanqueando o produto de PCR. O produto de PCR ORF25/26 poli A foi em seguida clonado em um vetor pCR2.1 TOPO para produzir pDAB3930. O sinal de ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foi removido de seu plasmídeo da espinha dorsal com NcoI e SacI e foi inserido em pDAB3914 no sítio NcoI/SacI usando T4 ligase para formar pDAB3931. SacII foi usado para remover o sinal de ER v2-WNV ME v3-KDEL de DASPICO72 (PicoScript, SEQ ID NO 14) de sua espinha dorsal Bluescript e o fragmento genético foi em seguida inserido em pDAB3931 no

sítio SacII em orientação reversa para formar pDAB3932. HindIII foi usado para excisar o produto de PCR ORF 25/26 poly A de pDAB3930. O ORF25/26 Poli A UTR foi em seguida inserido em orientação reversa em pDAB3932 em seu sítio HindIII para formar clone de entrada, pDAB3933.

5 pDAB3933 foi reagido com LR Clonase em pDAB3736 para formar o vetor de expressão e binário, pDAB3934.

Vetor binário Gateway®, pDAB3941 (Figura 18), contém os seguintes componentes da PTU: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMV promotor v2 / 15kD zein ER v2-WNV ME v2-KDEL v3 / Atu ORF23 3'UTR v1 /

10 AtUbi3 promotor v2 / 15kD zeína ER v2-WNV ME v3-KDELv3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. Este processo de clonagem de múltiplas etapas incluiu amplificar o promotor AtUbi3 v2 a partir de outro constructo usando iniciadores (dianteiro: 5' ccc aag ctt ata aga atg cgg ccg cta aac tat agc ttc gga ttt gga

15 gcc aag tc 3'; Reverso: 5' ccg ctc gag cgg tcc ccg cgg gga gct gaa ata aaa caa tag aac aag tag 3') que continham sítio HindIII/NotI na extremidade 5' do produto de PCR e sítios SacI/XhoI flanqueando o produto de PCR na extremidade 3'. O produto de PCR AtUbi3 v2 foi em seguida clonado no vetor pCR2.1 TOPO para produzir o plasmídeo pDAB3935. Um ligante XhoI (Sen-

20 so: cgatccgctcgagcggtagg; Antissenso: gtg acc cta ccg ctc gag cgg atc gag ct) foi adicionada a pDAB2406 no sítio SacI/BstEII para introduzir um sítio XhoI entre o promotor CsVMV v2 e ORF23 3'UTR v1 para produzir o vetor, pDAB3936. pDAB3936 foi em seguida cortado com XhoI e HindIII para remover o promotor CsVMV e reter o vetor da espinha dorsal. O produto de

25 PCR, promotor AtUbi3 v2, de pDAB3935 foi cortado com HindIII e XhoI e ligado na espinha dorsal pDAB3936 no sítio HindIII / XhoI, produzindo pDAB3937. O peptídeo de sinal de ER v2-ME v2-KDEL v3 de DASPICO20 (SEQ ID NO 12) foi removido de seu plasmídeo da espinha dorsal com NcoI e SacI e ligado em pDAB3912 no sítio NcoI/SacI para formar o vetor de

30 plasmídeo, pDAB3939. O peptídeo de sinal de ER v2-WNV ME v3-KDEL v3 de DASPICO72 (SEQ ID NO 14) foi removido de seu plasmídeo da espinha dorsal Bluescript com SacII-XhoI e foi inserido em pDAB3937 nos sítios Sa-

cII/XhoI para construir pDAB3938. O cassete genético AtUbi3 / sinal de ER v2-ME v3-KDEL v3 / ORF23 de pDAB3938 foi em seguida excisado com NotI e inserido em pDAB3939 no sítio NotI para formar clone de entrada, pDAB3940. Reação de LR clonase com pDAB3940 e vetor de destinação, pDAB3736, resultou na formação do vetor binário de dicot, pDAB3941.

Vetor binário Gateway®, pDAB3943 (Figura 19), contém os seguintes elementos: T-DNA Borda B / RB7 MAR v3 / CsVMVv2 / WNV M v2 E com sítios de glicosilação modificados (v5) / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 promotor v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / Múltiplo T-DNA Borda A. O processo de clonagem incluiu remover a região do sítio de N-glicosilação mutado do peptídeo de WNV prM v2 E v4 de DASPICO22 (SEQ ID NO 10) usando enzimas de restrição Accl e AvrII e ligando em pDAB3919 (consultar estratégia de clonagem de pDAB3920) nos sítios Accl/AvrII para estabelecer o clone de entrada, pDAB3942. pDAB3942 foi reagido com LR Clonase no vetor de destinação, pDAB3736, para produzir o plasmídeo binário de dicot final, pDAB3943.

Todos os constructos binários Gateway finais foram verificados inicialmente por digestão de restrição, seguida por sequenciamento entre as bordas de T-DNA, o que confirmou que a sequência real e esperada eram idênticas.

EXEMPLO 3 - TRANSFORMAÇÃO DE AGROBACTERIUM COM VETORES DE EXPRESSÃO EM PLANTA

De modo independente, 1,5 a 3 µg de DNA de plasmídeo para cada constructo de WNV foram adicionados a 50 µl de células de *Agrobacterium tumefaciens* Electromax® LBA4404 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e gentilmente misturados. A mistura foi transferida para cuvetas Gene Pulser® de 0,2 cm a frio (BioRad Hercules, CA) e colocada sobre gelo. As cuvetas foram em seguida colocadas em um rack Gene Pulser® a frio (BioRad, Hercules, CA) e electroporadas nas seguintes condições:

30	Capacitância de Saída	25 µFarad
	Extensor da Capacitância	960 µFarad
	Resistência	200 ohms

Voltagem

2,5 kVolts

Imediatamente depois da eletroporação, 950 µl de meio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi adicionado e a mistura foi transferida para um tubo Falcon 2059 (Becton Dickinson e Co., Franklin Lakes, NJ) ou equivalente. As células transformadas foram em seguida incubadas a 28°C por 1 hora. Depois da incubação, 50 µl, 100 µl, e 200 µl de células foram laminados sobre placas de meio YEP separado (10 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 10 g de sacarose, e 15 g de ágar em 1 Litro de água) contendo antibióticos conforme apropriado. As placas foram cultivadas invertidas a 28°C por aproximadamente 36 a 48 horas. Colônias únicas foram selecionadas e propagadas em 50 ml de YEP líquido (10 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, e 10 g de sacarose em 1 Litro de água), contendo antibióticos conforme apropriado, a 28°C por aproximadamente 36 horas. Seguindo o protocolo miniprep de baixo número de cópias Qiagen® (Qiagen, Valencia, CA), DNA de plasmídeo purificado foi preparado a partir das culturas bacterianas. A integridade do DNA foi avaliada por digestão de restrição. Clones com os padrões de formação de banda esperados foram identificados e estoques de glicerol foram preparados adicionando 500 µl de cultura bacteriana a 500 µl de glicerol estéril (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e invertendo para misturar. Os estoques de glicerol foram congelados sobre gelo seco e armazenados a -80°C.

EXEMPLO 4 - TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL DE CULTURAS DE CÉLULAS DE *NICOTIANA TABACUM* PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS WNV

Culturas de células NT-1 de *Nicotiana tabacum* foram mantidas aseticamente em um ciclo subcultura de uma semana, adicionando 2 ml da cultura de NT-1 ou 1 ml de células acondicionadas em 40 ml de meio NT-1 B (Tabela 3) dentro de um frasco de 250 ml. As suspensões foram mantidas no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ a 125 rpm.

Na preparação para transformação de cultura de NT-1, um estoque a 50% de glicerol de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor de expressão de interesse foi usado para iniciar uma cultura bacteriana líquida adicionando 20 a 500 µl de estoque de glicerol a 30 ml de meio líquido YEP

(10 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, e 10 g de sacarose em 1 litro de água) contendo 50 mg/l de espectinomicina e 100 µM de acetossiringona. A cultura bacteriana foi incubada no escuro a 28°C a 150 a 200 rpm até a OD₆₀₀ ser 0,5 a 0,6. Isto tomou aproximadamente 18 a 20 horas.

No dia de transformação, quatro dias depois da subcultura NT-1, 20 mM de acetossiringona (em etanol) foram adicionados a suspensões celulares em uma concentração de 1 µl por ml da cultura NT-1. As células NT-1 foram feridas para aumentar a eficiência da transformação puxando-as para cima e para baixo 20 vezes através de uma pipeta estéril de 10 ml de orifício padrão. Quatro mililitros da suspensão foram transferidos para dentro de cada uma das placas de Petri de 10, 60 x 20 mm. Uma placa foi separada para ser usada como um controle não-transformado. A cada uma das 9 placas restantes, 100 µl de suspensão de *Agrobacterium* foram adicionados. As placas foram embrulhadas com parafilme e incubadas no escuro a 100 rpm e 25 ± 1°C por 3 dias.

Eventos transgênicos também foram criados por um método alternativo que não usou acetossiringona quer em crescimento da cultura de *Agrobacterium* nem foi usado durante o processo de transformação de células de planta. Quatro mililitros da suspensão de tabaco (não ferido) foi transferido para dentro de cada uma das 10 placas de Petri de 100x25 mm. A cada uma de 9 placas, 100 µl de suspensão de *Agrobacterium* a OD₆₀₀ = 1,5 ± 0,2 foi adicionado, novamente mantendo 1 placa como um controle não-transformado. As placas foram redemoinhadas para misturar, embrulhadas em parafilme e cultivadas no escuro a 25 ± 1°C por 3 dias sem serem agitadas.

Depois do período de cocultivação para qualquer método de transformação, todo o líquido foi removido com as células e em seguida ressuspenso em 8 ml de meio NTC (meio NT-1 B contendo 500 mg/l de carbencilina, adicionado depois de autoclavar). Aliquotas de um mililitro de suspensão foram distribuídas a cada uma de 8 placas de Petri (100 x 25 mm) contendo meio NTC+B5 [meio NTC solidificado com 8g/l de Ágar TC, suple-

mentado com 5 mg/l de sódio fosfotricilalanina (bialaphos) depois de autoclavar]. Todas as placas de seleção, quer embrulhadas com parafilme ou deixadas desembulhadas, foram mantidas no escuro em 25 a 28°C. Antes de embrulhar, o líquido foi removido de quaisquer placas que estavam

5 excessivamente úmidas.

Depois de 2 a 8 semanas, transformantes putativos apareceram como pequenos aglomerados de calo sobre um fundo de células mortas, não-transformadas. Estes calos viáveis foram transferidos para meio fresco NTC+B5, atribuídos números de identificação, e mantidos como eventos de

10 transformação individuais. As placas foram deixadas desembulhadas, incubadas no escuro a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, e os eventos foram subcultivados sobre meio fresco NTC+B5 a cada 2 semanas por um total de 3 passagens, depois das quais a carbenicilina foi removida do meio para futuras subculturas. Porções de cada transformante putativo foram usadas para análise da expressão de

15 proteína. Eventos selecionados foram expandidos como calo e estabelecidos em cultura de suspensão.

Suspensões foram iniciadas transferindo 500 mg de calo transgênico proliferante de 7 dias de idade, para dentro de um frasco de 125 mL contendo 20 ml de NT1B + 10 mg/l de bialafos. As células e líquido foram

20 misturados pipetando 3 a 5 vezes com uma pipeta de 50 ml para romper o tecido e em seguida foram agitados em um agitador a 130 rpm no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As suspensões foram subcultivadas em uma base semanal transferindo 1 ml de células acondicionadas para dentro de 20 ml de NT1B com 10 mg/l bialaphos em um frasco de 125 ml. As suspensões foram mantidas no

25 escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ a 125 rpm.

EXEMPLO 5 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNA WNV

Padrão de referência de WNV inativado.

Antígeno de referência foi preparado por modificação de um método publicado (Blitvich, *et al.*, 2003). WNV foi inoculado em uma multiplicidade de infecção de aproximadamente 0,01 dentro de células VERO em cinco

30 frascos de rolo e incubado sobre um rack de rolo a 37°C. Dois frascos idênticos de células VERO não inoculadas foram alimentados com o mesmo

meio de crescimento (meio 199 com sais de Earles, 5% de soro bovino fetal, Penicilina / Estreptomicina) e incubados sob as mesmas condições. Depois de cinco dias, as células inoculadas e não inoculadas foram raspadas do interior de seus frascos. O meio e as células foram colocados dentro de tubos de centrífuga de 50 ml e peletizados a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram reunidas em 15 ml de meio de crescimento e congeladas a -80°C em 5 alíquotas iguais.

Um tubo de células infectadas e um tubo de células controle foram degeladas a 37°C. As células foram peletizadas a 3500 rpm por 10 minutos e lavadas duas vezes em 6 ml de tampão de salina de borato congelado (120 mM de cloreto de sódio, 50 mM de ácido bórico, hidróxido de sódio a 24 mM, pH 9,0), com centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 900 µl de 0,1% de dodecil sulfato de sódio, em seguida 100 µl de Triton X-100 e 2 ml de tampão de salina de borato foram adicionados à suspensão. A suspensão foi sonicada a 20% de produção por 30 segundos sobre gelo, transferida para tubos Eppendorf e centrifugadas em velocidade total em uma microcentrífuga por 10 minutos. Finalmente, os sobrenadantes foram transferidos para tubos Eppendorf limpos, 500 µl por tubo, e congelados a -80°C. Tubos Eppendorf contendo o material infectado com WNV foram etiquetados "WNV/VERO Antigen". Tubos Eppendorf contendo as células controle não inoculadas foram etiquetadas "Control VERO Antigen".

A inativação de WNV foi verificada inoculando quantidades de 50 µl e 25 µl de WNV/VERO Antigen sobre monocamadas de células VERO dentro de frascos de 150cm², incubando por 5 a 6 dias, em seguida passando o meio sobre células VERO frescas e incubando 6 dias. Algum dano de células VERO, atribuído ao detergente usado para inativação, foi observado na primeira passagem. A ausência de efeitos citopáticos na segunda passagem indicou o sucesso da inativação viral.

30 Western Blot de Proteína E do Vírus West Nile.

Um protocolo de *Western blot* foi desenvolvido para detectar proteína E usando anticorpos disponíveis comercialmente. Vírus West Nile ina-

tivado (WNV/VERO Antigen, a 5,1 µg/ml) foi preparado em tampão de amostra Leammli (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 40 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 2% de SDS, 10% de glicerol) e separado por SDS-PAGE sobre um gel Bis-Tris a 4 a 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proteínas foram transferidas para 0,2 µm de membrana de nitrocelulose por *eletroblot*. Blots de membrana foram bloqueados em tampão de bloqueio (bloqueador/diluyente WesternBreeze (*WesternBreeze Blocker/Diluent*, parte A e B), Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por incubação com um anticorpo monoclonal contra Vírus West Nile por no mínimo 1 hora (Mab8151 Ms X West Nile/Kunjin Vírus, Chemicon International, Temecula, CA diluído a 1:5000 em tampão de bloqueio ou Anticorpo Monoclonal contra WNV 7H2 (*WNV Monoclonal Antibody 7H2*), purificado por afinidade, BioReliance Invitrogen BioServices, Rockville, MD, 75 µg/ml em PBS-glicerol diluído a 1:500 em tampão de bloqueio). Depois de três etapas de lavagem de 5 minutos (solução de lavagem WesternBreeze (*WesternBreeze Wash Solution*) (16X), Invitrogen, Carlsbad, CA), os blots foram incubados em anticorpo de detecção. Para blots detectados por fosfatase alcalina, um anticorpo etiquetado com fosfatase alcalina anticamundongo de cabrea (Catálogo Número 075-1806, KPL, Gaithersburg, MD) foi diluído em tampão de bloqueio a 1:1000. Para blots detectados por peroxidase de rábano silvestre, um anticorpo etiquetado com peroxidase de rábano silvestre anticamundongo de cabra (Catálogo Número 074-1806, KPL, Gaithersburg, MD) foi diluído em tampão de bloqueio a 1:1000. Depois de incubação com anticorpo de detecção, os blots foram lavados e desenvolvidos com o substrato apropriado: substrato de fosfatase NBT/BCIP (NBT/BCIP Phosphatase Substrate, Catálogo Número 50-81-08, KPL, Gaithersburg, MD) para detecção por fosfatase alcalina ou Pierce SuperSignal (Catálogo Número 34080, Pierce, Rockford, IL) para peroxidase de rábano silvestre para visualizar as bandas.

ELISA de Proteína E do Vírus West Nile.

Placas ELISA de microtítulo de 96 poços Nunc Maxisorp foram preparadas por Beacon Analytical Systems Inc. (Portland, ME) revestindo placas com anti-WNV Equino (Novartis nº 215-006, Webster Veterinary Sup-

ply, Sterling, MA) em uma concentração de 2 µg/ml em tampão de carbonato, 100 µl por poço. As placas foram bloqueadas com 1% de BSA (Serologicals Corporation Inc., Norcross, GA) em PBST (1X PBS contendo 0,05% de Tween 20, Sigma Cat. nº P-1379), secadas, e embaladas para armazenamento a 4°C. No dia da ensaio, as placas foram aquecidas até a temperatura ambiente antes de carregar as amostras. Antígeno de referência de WNV (Antígeno WNV/VERO, a 5,1 µg/ml) foi diluído para 200 ng/ml em PBST. Amostras de planta foram pré-diluídas em PBST. O antígeno de referência diluído e amostras de antígeno de teste foram adicionados à placa aplicando 200 µl de amostra para duplicar poços em linha A e 100 µl de tampão de bloqueio às poços restantes. Foram feitas diluições seriais 2 vezes misturando e transferindo 100 µl por poço; para um total de 7 diluições e um em branco para o antígeno de referência e 4 ou mais diluições para amostras de teste. Em seguida as placas foram incubadas 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3X em PBST. Anticorpo monoclonal (Anticorpo Monoclonal de WNV 7H2, purificado por afinidade, BioReliance Invitrogen BioServices, Rockville, MD, 75 µg/ml em PBS-glicerol) foi diluído a 1:500 em 1% de BSA-PBST e adicionado a 100 µg/ poço seguido por incubação por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3X com PBST. Conjugado de anticorpo marcado com peroxidase de IgG anticamundongo de Cabra (BioRad 170-6516, Hercules, CA) diluído a 1:10.000 em 1% de BSA-PBST foi adicionado a 100 µl/ poço e as placas foram incubadas 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3X em PBST e 100 µl de substrato TMB (BioFX Laboratories Inc., Cowings, MD) foi adicionado a cada placa e incubado em temperatura ambiente por aproximadamente 5 a 10 minutos. A reação foi interrompida com HCl a 1 N. A densidade ótica foi lida a 450 nm menos um comprimento de onda de 650 nm de referência usando uma leitora de microlâmina cinética Vmax Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os dados foram transportados para software SoftMaxPro 4.0 e a curva padrão foi ajustada para uma equação logística de 4 parâmetros para quantificação da amostra.

Triagem de Transformantes Putativos.

Amostras de calo foram coletadas de transformantes putativos (Exemplo 4) em duplicata no dia 7 e no dia 14 depois de subcultura. Para cada amostra, 200 µl de calo foram coletados de um grupo homogeneizado de calo usando uma seringa de 1 ml (BD, Franklin Lakes, NJ) com o corte de
5 ponta. As amostras foram coletadas dentro de caixas de tubos de grupo de 96 poços (tubos de 1,2 ml, Costar, Corning, NY), congeladas sobre gelo seco e armazenadas a -80°C.

Na hora da análise, as amostras foram extraídas em 0,1% de DBDM (n-Dodecil b-D-maltosídeo, Sigma D4611) em PBS usando um bate-
10 dor de contas Kleco (Garcia Machine, Visalia, CA). Dois BB's de aço (Daisy de 4,5 mm) foram adicionados a cada tubo junto com 200 µl de DBDM-PBS. As amostras foram agitadas em velocidade máxima por 4 minutos seguidos por uma centrifugação por 10 minutos a 3000 x g. Os sobrenadantes foram removidos para novos tubos. O pélete resultante foi reextraído (200 µl de
15 tampão, 4 minutos de agitação, 10 minutos de centrifugação). Os sobrenadantes de ambas as extrações foram reunidos e usados para análise. Amostras de calo de 14 dias foram analisadas em uma série de diluição a 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Para confirmação da classificação de expressão, amostras de calo do dia 7 foram analisadas em uma diluição a 1:40. Os resultados de
20 triagem de expressão de eventos a partir dos constructos pDAB2475, pDAB2478, e pDAB2481 são resumidos nas Figuras 20 a 22. A comparação de eventos de expressão máxima entre os 3 vetores (Figura 23) indicou um potencial de recuperação de proteína E significativamente maior de pDAB2475.

25 Amostras de eventos selecionados destes constructos também foram analisadas por Western blot (calo do dia 14). As diferenças nos padrões de formação de bandas entre constructos foram evidentes. De muitos dos eventos pDAB2475, proteína E de extensão total foi detectada no tamanho esperado de ~54 kDa (Figura 24). Outras bandas de ~35 kDa e menores
30 também foram detectadas de modo reprodutível. Menos eventos expressando a proteína E de extensão total foram detectados com os constructos pDAB2478 e pDAB2481 (Figuras 25 e 26).

A Figura 27 é uma representação comparativa da expressão de proteína E dos 8 constructos restantes. Todos demonstraram proteína E expressada em células de plantas de tabaco, conforme detectado por ELISA. Adicionalmente, análise Western blot revelou proteína E de extensão total bem como trunicações (Figuras 28 a 30).

EXEMPLO 6 - ESCALA DE ANTÍGENOS DE WNV PRODUZIDOS POR CÉLULAS VEGETAIS

Escala e Fermentação de Cultura Celular.

Transformantes dos constructos pDAB2475 e pDAB2481, expressando proteína E de extensão total foram identificados para escala. Culturas de suspensão de *Nicotiana tabacum* NT1 de eventos individuais foram escaladas a partir de volume de trabalho de 20 ml em um frasco Erlenmeyer de 125 ml até 70 ml e em seguida 140 ml de volume total em um frasco de 250 ml com base no "volume celular acondicionado no frasco". O volume celular acondicionado no frasco foi determinado depois de um período de incubação de 7 dias aspirando uma amostra de 10 ml sob condições assépticas de um frasco de poço misturada para dentro de uma pipeta sorológica para um volume final de 10 ml. Depois de 30 segundos de sedimentação estática, o volume das células dentro da pipeta foi multiplicado por 10 e registrado como o "volume celular acondicionado no frasco" para diferenciar a medição de uma medição do volume celular acondicionado centrífugo (PCV). A faixa normal para o volume celular acondicionado no frasco foi variável (15 a 60%) para eventos individuais, mas se um volume celular acondicionado de $\leq 15\%$ não foi atingido dentro de 14 dias, o evento foi descontinuado.

Foi realizada manutenção e escala de cultura transferindo células de um frasco de 7 dias para um volume celular acondicionado do frasco final de 5%. Para culturas com um volume celular acondicionado de 50%, o volume de transferência do inóculo foi de 10% em vol:vol. Todas as culturas do frasco Erlenmeyer foram incubadas a 26°C em um agitador orbital com uma extensão de golpe de 5,08 cm (2") a 120 rpm por 7 dias. Fermentações utilizando o frasco Fernbach de 2.800 ml (volume de trabalho de 1.000 ml)

foram conduzidas em uma incubadora/agitador orbital com uma extensão de golpe de 5,08 cm a 110 rpm por 7 dias a 26°C. Fermentações conduzidas em fermentadores de 10 litros 10l Braun Biostat C foram iniciadas em uma velocidade de agitação de 200 rpm, um fluxo de ar de 4 litros por minuto, e
5 uma temperatura do vaso de 26°C. Oxigênio dissolvido foi mantido acima de 30% por um loop controle de PID que aumentou automaticamente a taxa de agitação entre 200 e 450 rpm.

Para avaliar e caracterizar as culturas cultivadas em fermentador, amostras de 10 ml in-processo foram coletadas dentro de tubos de centrífuga graduados de 15 ml sob condições assépticas em intervalos de 24 ho-
10 ras. De cada amostra, 10 µl foram assentados para isolamento sobre ágar de soja triptica para avaliação de crescimento estranho. Placas de Petri foram incubadas a 30°C por dois dias, e em seguida classificadas para a presença de crescimento bacteriano ou fúngico. Amostras contendo crescimen-
15 to estranho foram verificadas por microscopia ótica em ampliação a 1.000x em compilações de amostras subsequentes. Fermentadores que se verificou que continham crescimento estranho foram autoclavados e as culturas foram adequadamente descartadas.

O remanescente de cada amostra de fermentação foi centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos para separar as células de plantas do líquido da cultura celular. O PCV foi determinado por observação direta do volume (ml) de células acondicionadas no tubo depois da centrifugação. A medição do volume final foi multiplicada por 10 e registrada como o PCV no momento da compilação. Cerca de 3 a 4 ml da fase de sobrenadante clara do tubo foi
20 transferido para dentro de uma seringa de 3 ml e filtrado (Corning PTFE nº 431231) para dentro de um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 ml. O conteúdo do tubo foi analisado para glicose, pH, acetato, orto-fosfato, amônia, sódio, potássio, e lactato usando o analisador bioquímico Bioprofile 300A Biochemistry Analyzer (Nova Biomedical, Boston, MA).

30 Para proteína solúvel total e concentração de proteína recombinante, a amostra remanescente de sobrenadante e células acondicionadas foi tratada adicionando 2 a 3 mm de carga (*shot*) de aço inoxidável, e em

seguida colocando o tubo de amostra de 15 ml em um triturador Geno Grin-
 der por 2 minutos em taxa de agitação máxima. A fração livre de células foi
 coletada depois de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, e a fração de
 pélete foi ressuspensa em um tampão consistindo em PBS, pH 6,8, com
 5 0,1% de β -D-dodecil maltosídeo. O pélete ressuspenso foi colocado de volta
 dentro do triturador Geno Grinder e agitado por 2 minutos. Depois de centri-
 fugação a 10.000 rpm por 5 minutos, as frações de sobrenadante foram reu-
 nidas e avaliadas para proteína solúvel total usando o método de Bradford.
 Extratos também foram analisados para proteína E de WNV por ELISA e
 10 *Western blot* (vide o Exemplo 5).

Eventos de dois constructos, pDAB2475 e pDAB2481, foram
 escalados para reatores de tanque agitado de 10 L. Um sumário dos lotes de
 fermentação é apresentado na Tabela 4.

Medições à base do tempo da produção de proteína recombi-
 15 nante em fermentadores indicaram que o maior título volumétrico foi produ-
 zido em 188 horas para o evento 1622-207 e em 172 horas para o evento
 1702-525. Critérios de colheita com base na produtividade volumétrica ótima
 foram desenvolvidos com base em alterações: (1) glicose residual no fer-
 mentador, (2) volume celular acondicionado, (3) análise gasosa respiratória,
 20 (4) oxigênio dissolvido, e (5) pH (Figuras 31 a 33). O tempo de colheita ótimo
 com base na produtividade volumétrica foi similar para todos os eventos, e
 ocorreu 46 horas depois da depleção de glicose. A depleção de uma ou mais
 fontes de carbono correspondeu a um aumento no pH de $5,90 \pm 0,12 -\log H^+$
 a $6,5 \pm 0,24 -\log H^+$, um escurecimento visível do caldo de fermentação, e
 25 uma redução >85% na atividade respiratória conforme evidenciado pela cap-
 tação de oxigênio; evolução de dióxido de carbono, e oxigênio dissolvido. O
 evento 1622-207 apresentou um título volumétrico de $1,570 \pm 0,077$ (média $\pm$
 desvio padrão) mg de proteína 'E' / l de volume de trabalho do fermentador e
 uma produtividade de $0,200 \pm 0,010$ (média $\pm$ desvio padrão.) mg de proteí-
 30 na 'E' / l de volume de trabalho do fermentador / dia (consultar Tabela 4, Lote
 WNV-SRD05006).

A cinética de produção de ME e prME(-) em células de suspen-

são de *N. tabacum* NT-1 foi determinada durante um período de 9 dias para eventos de Vírus West Nile recombinante 1622-207 e 1622-210 (Figura 34). Perdas significativas (até 50%) em proteína recombinante foram observadas para fermentações que excederam um período de tempo de 8 dias (>70 horas além da depleção de glucose). *Western blots* para amostras de fermentação envelhecidas apresentaram significativa truncação da proteína 'E', e uma maior percentagem de proteína 'E' truncada e de extensão total no sobrenadante a 8.000 x g depois de disrupção celular (dados não mostrados). A tendência para baixo na produtividade volumétrica que é mostrada na Figura 34 pode ser o resultado de diferenças na reatividade do anticorpo ELISA primário com proteína 'E' truncada, e/ou um aumento da perda de proteína 'E' devido a alterações nas propriedades de particionamento da proteína. Devem ser realizados estudos adicionais para investigar este fenômeno.

EXEMPLO 7 - PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS DE WNV PRODUZIDOS POR CÉLULAS DE PLANTAS

Processamento a jusante de culturas de células cultivadas em biorreatores de 10 litros consistiu em seis procedimentos que foram conduzidos em paralelo. Todos os procedimentos foram completados em 0 a 4° C sob condições assépticas. Devido a alterações induzidas por pH reportadas para a estrutura quaternária de proteína E resultante na formação de um trímero inativo (Modis *et al.*, 2004), o pH de todas as amostras do processo e de cultura celular foi mantido a $7,0 \pm 0,2$ usando 50 mM (pH 7,5) de ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico (MOPS; pKa = 7,2) como um tampão padrão para todas as condições, a menos que determinado de modo diverso.

Método 1 do processo (PM1):

As células da suspensão vegetal foram colhidas do meio usado uma camada de 30 µm de Spectramesh e um funil de Buchner de 25 cm de diâmetro. A torta a úmido foi lavada com um volume igual de tampão de lise (50 mM de MOPS, pH 7,5 + 1 mM de EDTA), secada por filtro (70 s em uma pressão de vácuo de coluna de água de 63,50 cm (25 polegadas), e em seguida ressuspensa em tampão de lise (50 mM de MOPS, pH 7,5 + 1 mM de EDTA) até uma concentração final de 33% (em peso : vol). A suspensão ce-

lular foi rapidamente (3 minutos) homogeneizada usando um homogeneizador de laboratório Silverson L4R, equipado com uma cabeça de rotor-estator de 3 cm, e operada a 1.500 rpm. As células pré-homogeneizadas foram rompidas por duas passagens através de um disruptor celular Microfluidics de 110 L, o qual foi operado a 110,3 mPa (16.000 psi) (pressão do caminho de fluxo medida). Depois de clarificação centrífuga do lisado a 8.000 x G por 15 min, o sobrenadante foi decantado do pélete (descartar pélete), e armazenado a -20°C até as ensaios serem realizadas.

Método 2 do processo (PM2):

As células colhidas foram centrifugadas a 8.000 x G por 15 min, e o meio usado foi decantado da pasta celular. O pélete celular foi ressuspensionado com 150 mL de tampão de lise, congelado a -20°C por um mínimo de 16 horas, e em seguida degelado em um banho-maria a 25°C. As células degeladas foram ressuspensionadas para uma concentração final de 33% (em peso : vol) em tampão de lise, e rapidamente (3 minutos) homogeneizadas usando um homogenizador de laboratório Silverson L4R, equipado com uma cabeça de 3 cm de rotor-estator, e operado a 1.500 rpm. A pasta semifluida celular homogeneizada foi rompida a 110,3 mPa (16.000 psi) por duas passagens através de um disruptor celular Microfluidics de 110 L, e o lisado foi clarificado conforme descrito em PM1.

Método 3 do processo (PM3):

Agrimul NRE-1406 (464 g/mol; Cognis Corp., Cincinnati, OH) e MOPS, pH 7,5 (conc. final de 50 mM) foi adicionado diretamente à cultura celular colhida em um frasco Erlenmeyer de 500 mL até uma concentração final de 0,3% (em peso : vol). O frasco foi agitado sobre uma placa de agitação magnética a 100 rpm usando uma barra de agitação de 5,08 cm por 30 minutos. A suspensão celular foi rapidamente (3 minutos) homogeneizada usando um homogeneizador de laboratório Silverson L4R, equipado com uma cabeça de 3 cm de rotor-estator, e operado a 1.500 rpm. A suspensão pré-homogeneizada foi rompida por duas passagens através de um disruptor celular Microfluidics de 110 L, o qual foi operado a 110,3 mPa (16,000 psi). Depois de clarificação centrífuga do lisado a 8.000 x g por 15 min., o sobre-

nadante foi decantado do pélete (descarta pélete), e armazenado a -20°C até as ensaios serem realizadas.

Método 4 do processo (PM4):

O método 4 do processo seguiu o processo descrito no método 2 do processo, exceto que 0,3% (em peso : vol) de Deriphat 160 (Cognis Corp., Cincinnati, OH) foi adicionado à pasta celular degelada antes de homogenização com o homogenizador de laboratório. Todos os outros procedimentos foram idênticos a PM2.

Método 5 do processo (PM5):

Foi conduzida precipitação de sulfato de amônio sobre a fração clarificada de PM2 usando três etapas de fracionamento separadas: Etapla 1: Uma solução saturada a 20% (com base em uma temperatura de 25°C) de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) foi preparada adicionando 114 g/l de (NH₄)₂SO₄ diretamente à fração clarificada de PM2. A solução (temp medida = 15°C) foi agitada a 100 rpm por 10 minutos e em seguida centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos para remover proteínas precipitadas. O sobrenadante, o qual continha proteína E do vírus West Nile e foi referido como a fração s0-20%, foi coletado e transferido para a etapa 2. Etapla 2: Uma solução saturada a 30% de (NH₄)₂SO₄ foi preparada adicionando 59 g/l de (NH₄)₂SO₄ diretamente à fração s0-20%. A solução (temp medida = 15°C) foi agitada a 100 rpm por 10 minutos e em seguida centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos para remover proteínas precipitadas. O sobrenadante, o qual continha proteína E do vírus West Nile e foi referido como a fração s20-30%, foi coletado e transferido para a etapa 3. Etapla 3: Uma solução saturada a 40% de (NH₄)₂SO₄ foi preparada adicionando 62 g/l de (NH₄)₂SO₄ diretamente à fração s20-30%. A solução (temp medida = 8°C) foi agitada a 100 rpm por 10 minutos e em seguida centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos para remover proteínas precipitadas. O pélete adquirido da etapa de centrifugação, a qual continha proteína E do vírus West Nile e foi referida como o precipitante p30-40%, foi decantado do sobrenadante (descartar sobrenadante), e armazenado a -20°C até as ensaios serem realizadas.

Método 7 do processo (PM7):

O método 7 do processo seguiu o processo descrito no método 1 do processo, exceto que a fração do sobrenadante depois da ruptura celular e centrifugação foi descartada e a fração de particulado foi adicionalmente processada para recuperar proteínas de WNV recombinantes. A fração de particulado foi diluída até uma concentração final de 20% (em peso : vol) em 50 mM de MOPS, pH 7,5 e 1 mM de EDTA. Deriphat 160 (um tensoativo anfotérico de Ácido Monossódico N-Lauril-beta-Iminodipropiônico [Cognis Corporation, Cincinnati, OH]) foi adicionado diretamente à suspensão diluída para obter uma proporção de detergente para proteína solúvel total de $1,30 \pm 0,14$ mg de Deriphat 160 por mg de proteína solúvel total. De modo a acelerar as etapas de processamento primário, uma correlação baseada em uma equação linear foi desenvolvida entre proteína solúvel total na fração de particulado livre de células e o volume celular acondicionado por colheita para o fermentador. A quantidade requerida de detergente Deriphat 160 foi rapidamente calculada usando a medição do volume celular acondicionado centrífugo final com base na Equação 1:

Equação 1:

$$Deriphat_ (g) = \%Final_PCV * Sample_Vol(L) * 0.0341$$

onde:

Deriphat_(g) é a quantidade de Deriphat 160 adicionado à fração de particulado ressuspensão.

% Final_PCV é a medição de PCV centrífugo da cultura celular como uma percentagem.

Sample_Vol (L) é o volume total em litros da cultura celular na colheita.

0,0341 = concentração de proteína final para constante de conversão da inclinação do PCV da colheita.

A suspensão foi homogeneizada usando um homogeneizador de laboratório Silverson L4R, equipado com uma cabeça de rotor-estator de 3 cm, e operado a 1.500 rpm por 10 minutos, e em seguida centrifugado a 8.000 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi decantado do pélete (pélete descartado), e armazenado a -20°C até as ensaios serem realizadas.

Todas as amostras de preparativo (>40 ml) foram reduzidas em volume por liofilização em bandejas de aço inoxidável de 3 litros. As amostras foram transferidas para uma bandeja de aço inoxidável e congeladas a -80°C por 16 horas, em seguida foram transferidas para um liofilizador modelo 422116 Genesis Vertis com uma temperatura do condensador de -44°C e uma temperatura da prateleira inicial de -10°C. O programa de secagem consistiu de 7 etapas cronometradas nas seguintes temperaturas: -10°C por 20 minutos, -5°C por 200 minutos, 0°C por 400 minutos, 5°C por 200 minutos, 10°C por 200 minutos, 15°C por 200 minutos, e 25°C por 4000 minutos.

O produto foi considerado seco se a pressão do vácuo final (usando uma temperatura de prateleira de 25°C) puder ser mantida abaixo de 100 mTorr. Frações do preparativo secas das bandejas de 3 L foram ressuspensas em um volume mínimo (<40 ml) de água destilada estéril e em seguida transferidas para um frasco de soro estéril de 100 mL. Os frascos foram transferidos para um freezer a -80°C sobre um rack de congelamento em ângulo (25°) por 16 horas. Os frascos foram secados de acordo com o programa de secagem do preparativo.

A Tabela 5 resume as diferentes amostras preparadas para avaliação em uma ensaio clínica (Estudo I). Estas amostras representam dois constructos de expressão vegetal, três eventos e cinco métodos de processo, junto com controles negativos e positivos.

EXEMPLO 8 - FORMULAÇÃO DE ANTÍGENOS DE WNV PRODUZIDOS POR CÉLULAS DE PLANTAS, ESTUDO I

Dois constructos de expressão vegetal, três eventos e cinco métodos de processo foram usados para produzir vacinas e vacinas de controle negativo para avaliação clínica de antígenos de WNV produzidos por células vegetais em camundongos. Todas as vacinas foram combinadas com adjuvante completo de Freund para a primeira dose e adjuvante incompleto de Freund para a segunda. WNV inativado foi formulado para uso como um controle positivo.

Formulação de antígeno produzido por célula vegetal.

No início da formulação da vacina, foi preferencial a preparação

de doses de 100 ou 50 µg. Portanto, o material vegetal liofilizado foi reidratado na quantidade mínima de água destilada requerida para passar através da agulha de uma seringa. Com um máximo de 100 µl de volume de antígeno por dose, a dose foi consequentemente determinada por solubilidade do material vegetal (Tabela 6). O antígeno liofilizado para o grupo de tratamento 3 foi insolúvel e removido do estudo; o antígeno liofilizado para o grupo 1 não foi suficientemente concentrado para atingir a dose de 100 µg no volume de 100 µl requerido e também foi removido do estudo. Preparações de controle negativo foram reidratadas com a quantidade mínima de água requerida e em seguida trazidas até aproximadamente 1 ml com água adicional.

Uma alíquota de antígeno reidratado foi emulsificada com um volume igual de adjuvante completo de Freund (ICN 642851) usando duas seringas de vidro de 2 ml e uma agulha de micro-emulsificação de 2 7/8 polegadas calibre 20. As vacinas foram mantidas sobre gelo do início ao fim, e suspensões de estoque reidratadas foram congeladas a -80°C imediatamente depois do uso. Para um segundo uso, o material vegetal previamente reidratado foi degelado em temperatura ambiente e emulsificado com um volume igual de adjuvante incompleto de Freund (ICN 642861) usando as mesmas seringas e agulhas que antes. As emulsões foram mantidas sobre gelo e injetadas imediatamente depois da preparação de todas as vacinas.

Formulação de antígeno de referência.

A partir do padrão de referência de WNV inativado (descrito no Exemplo 5), Triton X-100 foi removido com uma coluna de spin "Detergent-OUT" da Chemicon International antes de formulação para uso como uma vacina. A dose se basou na concentração de proteína E de WNV a 27,2 µg por mL (Tabela 6).

EXEMPLO 9 - PRODUÇÃO DE SORO NEUTRALIZANTE DE WNV COM ANTÍGENOS PRODUZIDOS POR CÉLULAS DE PLANTAS, ESTUDO I

30 Vacinação de camundongos.

Camundongos SPF fêmeas, CD-1 não consanguíneos, (Charles River) foram adquiridos e aclimatados às instalações do estudo antes da

vacinação. Os camundongos foram alojados, 5 por gaiola, e identificados por número do grupo com um clipe de orelha. No dia 0, aos 50 dias de idade, todos os camundongos receberam uma dose de 200 µL dos vários tratamentos conforme descrito na Tabela 6 (Exemplo 8). As vacinações foram liberadas a partir de uma seringa de 1 ml com uma agulha calibre 27 em quatro sítios de 50 µL cada por via subcutânea na região abdominal. Devido a um atraso na disponibilidade de reagentes, os camundongos do Grupo 12 foram vacinados um mês depois dos outros e portanto foram vacinados aos 80 dias de idade. No dia 17, os camundongos receberam uma segunda dose de 200 µL dos vários tratamentos conforme descrito na Tabela 6 (Exemplo 8). As vacinações foram liberadas em quatro sítios de 50 µL cada por via subcutânea na região do abdômen. O Grupo 12 foi revacinado em 14 dias ao invés de 18. Dois camundongos do Grupo 4 adoeceram depois da segunda vacinação e um morreu 30 horas depois.

15 Coleta de soro.

No dia 31, os camundongos foram anestesiados por breve exposição a CO₂ e foram exsanguinados por punção cardíaca. O sangue foi coletado dentro de tubos Eppendorf etiquetados, deixado para coagular, e centrifugado para sedimentar as células remanescentes. O soro foi mantido a -80°C até a hora da ensaio. Os camundongos Grupo 12 foram exsanguinados no dia 28 ao invés de 32.

Ensaio de Neutralização Sérica de WNV.

Todas as ensaios de neutralização sérica foram realizadas em um laboratório BL-3. Os títulos de neutralização foram medidos em uma ensaio sérica variável, de vírus constante, sobre células VERO. Soro inativado por calor (30 minutos a 56°C) foi diluído a partir de 1:10 em etapas duplas até 1:1280 em uma placa de microtitulação, dois poços por diluição, em Meio 199 com 5% de soro bovino fetal (FBS). Estoque de vírus WNV, um isolado de centrocercos do Wyoming, foi diluído para 1:10 no mesmo meio e um volume igual foi adicionado ao soro dentro de cada poço, dando diluições séricas finais de 1:20 a 1:2560. As placas foram incubadas por 30 minutos para permitir ao soro neutralizar o vírus, e em seguida 12.000 células VERO em

um volume igual do mesmo meio foram adicionadas a cada poço para detectar vírus não-neutralizado. Controles (soros positivos conhecidos, poços não infectados, e titulação do vírus) foram incluídos sobre uma placa separada. As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 13 dias e observadas
5 microscopicamente em intervalos para a presença de efeito citopático (CPE).

A leitura da ensaio final foi em 13 dias. O controle de células não infectadas não teve CPE. Os títulos de neutralização das amostras de teste foram expressados como a recíproca da diluição final de soro presente nas misturas de soro e vírus no desfecho de 50%. A retrotitulação de WNV foi
10 >128 TCID₅₀ por poço. Soro de controle positivo anti-WNV de coelho teve um título de >2560. Soros de camundongos vacinados tiveram títulos de neutralização conforme mostrado na Tabela 7. Alterando títulos de neutralização de >2560 a 2560 (o título máximo que a ensaio pode medir) e títulos de <20 a 20 (o título mínimo que a ensaio pode medir) e calculando um título
15 de média geométrica por grupo, foi gerada a Figura 35. A Figura 35 proporciona uma apresentação gráfica de títulos de neutralizantes séricos de WNV.

O teste t de Student mostrou que os títulos do Grupo 2 foram estatisticamente maiores do que todos os outros grupos exceto o Grupo 5 e que os Grupos 4 e 5 não foram estatisticamente diferentes. O controle positivo para WNV inativado (Grupo 12) foi medido em uma ensaio separada
20 com uma diluição de desfecho maior e portanto não foi rigorosamente comparável aos outros resultados.

Em conclusão, todas as preparações de proteína E de WNV produzidas por células de planta usadas para vacinação, independente da
25 quantidade de proteína E presente ou do método do processo, produziram anticorpos neutralizantes. Preparações de controle negativo não produziram anticorpos neutralizantes (Grupos 8, 9, 11, e 13).

Em geral, as injeções foram bem toleradas pelos animais. Não está evidente se a doença e a única morte depois da segunda injeção do
30 Grupo 4 foi devida a trauma físico ou a uma reação adversa ao antígeno, o adjuvante, ou outros componentes da vacina.

EXEMPLO 10 - PRODUÇÃO DE SORO NEUTRALIZANTE DE WNV COM

ANTÍGENOS PRODUZIDOS POR CÉLULAS DE PLANTAS, ESTUDO II

Para confirmar e entender mais a eficácia de the plant-cell-produced antígenos de WNV no modelo de camundongo, foi adquirido um grupo adicional de camundongos e foram imunizados com doses elevadas, médias, e baixas de antígeno formuladas com cinco adjuvantes diferentes, conforme listado na Tabela 8. O evento de transformação e método do processo para recuperação de antígeno não foram variados. O evento (pDAB 2475) 1622-207 colhido por PM7 foi usado exclusivamente neste estudo.

Formulação de vacinas.

A formulação de vacinas foi iniciada reidratando extrato de planta de WNV liofilizado. Foi adicionada água suficiente a cada um de cinco frascos para produzir uma solução de antígeno a 125 µg/ml. Foi feita reidratação usando água estéril e usando agulhas e seringas estéreis para a adição de água. As soluções reidratadas foram reunidas dentro de um novo frasco estéril. Em seguida a solução foi homogeneizada por 50 passagens através de uma válvula reguladora estéril de três posições usando duas seringas estéreis. A solução homogeneizada foi reunida dentro de um novo frasco estéril.

Lotes de seis mililitros de cada vacina de 25 µg/dose foram preparados primeiro extraíndo 3,0 ml de solução de antígeno dentro de uma nova seringa descartável estéril de 10 ml. Em seguida, 3,0 ml de adjuvante esterilizado foram extraídos dentro de uma segunda nova seringa descartável estéril. Ambas as seringas foram ajustadas a uma nova válvula reguladora estéril de três posições. O extrato de planta foi em seguida movido para dentro da seringa de adjuvante através da válvula reguladora. A vacina foi emulsificada passando a vacina entre as duas seringas através do 50 ciclos. No completamento do último ciclo a seringa contendo a vacina foi removida da válvula reguladora. A vacina foi transferida para dentro de frascos de seringa de soro estéreis, selados e etiquetados. Vacinas embaladas foram armazenadas a 4 °C. As vacinas foram mantidas a 4°C até serem usadas.

Para formular as vacinas de 5 µg/dose, uma porção da solução de extrato de planta original de 125 µg/ml foi diluída com água para produzir

uma solução a 25 µg/ml. Esta solução de antígeno diluída foi usada para formular estas vacinas. O procedimento resumido acima foi repetido para cada uma das cinco vacinas de teste usando novas seringas estéreis e válvulas reguladoras de três posições para cada vacina.

5 As vacinas de 0,5 µg por dose foram formuladas usando uma porção da solução de antígeno a 25 µg/ml diluída até 5 µg/ml. Esta solução de antígeno diluído foi usada para formular estas vacinas. Os mesmos procedimentos previamente resumidos foram usados para produzir as cinco vacinas da ensaio neste nível de dose.

10 Adjuvante Titer-Max é incompatível com borracha de neopreno. Não se deve deixar vacinas contendo adjuvante Titer-Max entrar em contato com borracha de neopreno. Portanto, todas as seringas plásticas foram usadas durante a formulação e septos revestidos de Teflon foram usados para selar os frascos de soro para as vacinas embaladas.

15 Formulação de Controle de Célula Vegetal.

Dois frascos de extrato NT-1 Tobacco Cell não-transgênico liofilizado foram reidratados com água estéril para produzir uma solução similar à solução de antígeno a 125 µg/ml. Esta solução de controle em branco foi homogenizada na mesma maneira que a solução de antígeno. A vacina de controle foi formulada usando os mesmos procedimentos que as vacinas de 25 µg/dose. Conforme determinado anteriormente todas as seringas plásticas e um septo revestido de Teflon foram usados com esta vacina.

Vacinação de Camundongos.

Camundongos SPF fêmeas, CD-1 *outbred*, (Charles River) foram recebidos de uma única colônia em recipientes de remessa de 40 camundongos cada. Os camundongos foram alojados 5 por gaiola, aclimados às instalações do estudo, e o número do seu grupo foi identificado com um clipe de orelha. Com 10 a 11 semanas de idade, todos os camundongos receberam uma dose de 200 µL dos vários tratamentos conforme descrito na Tabela 8. As vacinações foram liberadas de uma seringa de 1 ml com uma agulha calibre 27 em quatro sítios de 50 µL cada, por via subcutânea na região abdominal.

Dentro de 48 horas depois da primeira vacinação, foi evidente que os camundongos nos grupos 6 a 8 estavam reagindo localmente e sistemicamente à injeção. Os camundongos que receberam vacinas formuladas com carbopol pararam de comer e de beber, se amontoaram juntos, e
5 cresceu o pelo. A estes camundongos não foram administradas quaisquer vacinações adicionais.

No dia 15, camundongos nos grupos 1 a 5 e 9 a 17 receberam uma segunda dose de 200 µL dos vários tratamentos conforme descrito na Tabela 8. As vacinações foram liberadas asiem quatro sítios de 50 µL cada
10 subcutaneamente na região do abdômen. Não foram observadas reações adversas nestes grupos.

Coleta de soro.

No dia 22, camundongos nos grupos 6-8 foram anestesiados por breve exposição a CO₂ e exsanguinados por punção cardíaca. No dia 28,
15 camundongos em todos os outros grupos foram anestesiados de modo similar e exsanguinados. O sangue foi coletado dentro de tubos Eppendorf etiquetados, deixado para coagular e centrifugado para sedimentar as células remanescentes. O soro foi mantido a $\leq -80^{\circ}\text{C}$.

Ensaio de Neutralização Sérica de WNV.

20 Todos os ensaios de neutralização sérica foram realizados em um laboratório BSL-3. Os títulos de neutralização foram medidos em um vírus constante, variando o ensaio sérico sobre células VERO. Soro inativado com calor (30 minutos a 56°C) foi adequadamente diluído em uma placa de microtitulação, cinco poços por diluição, em DMEM com 2% de soro bovino
25 fetal (FBS). Estoque de vírus WNV, um isolado de centrocercos do Wyoming, foi diluído para obter uma faixa de 100-300 TCID₅₀/25 µl no mesmo meio de diluição e um volume igual foi adicionado ao soro dentro de cada poço. As placas foram incubadas por 60 minutos para permitir que o soro neutralizasse o vírus, e em seguida 20.000 a 30.000 células VERO em 150 µl de meio
30 foram adicionadas a cada poço para detectar vírus não-neutralizado. Controles (soros positivos conhecidos, poços não infectados, e titulação do vírus) foram incluídos sobre uma placa separada. As placas foram incubadas a

37°C em 5% de CO₂ por 4 a 7 dias e foram observadas microscopicamente em intervalos para a presença de efeito citopático (CPE). O controle celular não infectado não teve CPE. A retro titulação de WNV foi 194 TCID₅₀ por poço. Os títulos de neutralização desconhecidos foram expressados como a
 5 recíproca da diluição final de soro presente nas misturas de soro e vírus na diluição onde as células não foram infectadas.

Muitos camundongos vacinados desenvolveram altos níveis de anticorpos neutralizantes e a reação variou com a dose de antígeno e o adjuvante (Figura 36). Os anticorpos não foram engendrados em camundongos
 10 que receberam adjuvante e células NT-1 somente (Grupo 1, dados não mostrados). É evidente que E proteína de WNV produzida por célula de planta foi altamente imunogênica e possui no mínimo um epítipo requerido para produzir anticorpos neutralizantes. O fato de que uma única injeção engendrou anticorpos neutralizantes nos camundongos injetados com a formulação de
 15 carbopol (Grupos 6 a 8) sugere que o antígeno induziu um nível protetor de IgM. Embora as diferenças entre alguns grupos fossem estatisticamente significantes em $p < 0,05$, não foram claros padrões óbvios devido à inerente variabilidade dentro do ensaio.

EXEMPLO 11 - DEMONSTRAÇÃO DE EFICÁCIA PROTETORA DE ANTÍ- 20 GENO PRODUZIDO POR CÉLULAS DE PLANTAS EM CAVALOS.

Para confirmar e entender adicionalmente a eficácia dos antígenos de WNV produzidos por células de planta na espécie equina, cavalos foram adquiridos e vacinados com altas e baixas doses de antígeno formuladas com 2 diferentes adjuvantes, conforme listado na Tabela 17. O evento
 25 de transformação e método de processo para recuperação de antígeno não foram variados. O evento (pDAB 2475)1622-207 colhido por PM7 foi exclusivamente usado neste estudo.

Formulação de vacinas.

A formulação de vacinas foi iniciada por reidratação de extrato
 30 de planta WNV liofilizada, usando o mesmo lote de antígeno como no Estudo II (Exemplo 10). As concentrações alvo das vacinas foram 10 e 1 µg/ml. O antígeno liofilizado foi reidratado com água estéril até 70 ml de volume e

concentração de 20 µg/ml, com base na concentração de proteína E determinada por ELISA antes da liofilização do extrato. Depois de reidratação, a solução de estoque de antígeno foi homogeneizada para proporcionar uma solução uniforme. Foi realizada homogeneização usando duas seringas de 20 ml conectadas a uma válvula reguladora de três posições. A solução foi passada para frente e para trás entre as seringas por 50 ciclos e em seguida colocada dentro de um novo frasco estéril de 100 ml. Uma vez homogeneizado, o estoque foi filtrado estéril para dentro de um novo frasco plástico estéril. Filtração estéril foi realizada usando unidades de filtro Millipore Sterivex – GV, de 0,22 µm (Número do Lote H4NN92488). Neste ponto o material foi amostrado usando técnicas estéreis tanto para ensaio ELISA quanto para ensaio de Esterilidade. A ensaio de Esterilidade necessitou de duas semanas para completar e confirmou que a solução era estéril dentro dos limites do teste descrito abaixo. Ensaio ELISA confirmou que a solução de estoque continha aproximadamente 20 µg/ml. Este valor de concentração foi consistente com os valores prévios para este material.

Solução de Estoque de Carbopol 974 P NF.

Tampão estéril de 1X PBS foram preparados primeiro diluindo 100 ml de Fisher Scientific Brand PBS: 10X solução de Salina Tamponada com Fosfato (Lote nº 044924-36) para 1 litro em água DI. 500 ml de 1X PBS foi transferido para dentro de um béquer limpo de 600 ml equipado com uma barra de agitação magnética. 5,0 gramas de Carbopol 974P NF (Noveon, Lote nº CC52NAB635) foram dispersados dentro do tampão de PBS usando o agitador magnético. A mistura foi agitada por 30 minutos para assegurar a dispersão do pó. O béquer agitado foi equipado com uma sonda de pH, e o pH da solução foi ajustado para estar dentro de uma faixa de pH de 6,8 a 7,6 usando Solução de Hidróxido de Sódio, 50% em peso/ peso (Fisher Brand, Lote nº 0430451-24). Uma vez que o pH foi ajustado, a solução foi deixada para agitar por um adicional de 30 minutos para assegurar que o pH estivesse estável. Este procedimento resultou em 10 mg/ml (10.000 µg/ml) de uma solução de estoque de Carbopol 974P NF neutralizado. A solução final foi transferida para dentro de vários tamanhos de frascos limpos Pyrex Media

Bottles e etiquetados. Os frascos foram em seguida autoclavados por 45 minutos, 121°C, e 124,1 kPa (18 psi) para assegurar a esterilidade. Na remoção do autoclave, os frascos foram selados e deixados para esfriar em uma coifa. Antes da montagem da vacina, um frasco de solução de estoque de Carbopol 974P NF foi selecionado e submetido a ensaio de esterilidade conforme descrito abaixo.

Solução de Estoque a 30% de Polygen.

Polygen é um adjuvante disponível comercialmente. P fabricante de Polygen recomenda que o produto seja diluído para uma solução a 30% antes da formulação. Também se recomenda que as vacinas sejam formuladas para conterem 15% em vol/ vol de Polygen como o pacote de adjuvante. Solução de Estoque a 30% de Polygen foi preparada em um gabinete BL2 Biosafety, transferindo 140 ml de água estéril para um frasco estéril de 250 ml de policarbonato. 60 ml de Polygen (MVP Laboratories, Inc. Ralston, NE, Lote 10011) foi adicionado à água estéril e misturado, resultando em uma solução de Polygen a 30%. Esta solução foi em seguida transferida para um frasco de 250 ml Pyrex Media Bottle e autoclavado. Na remoção do autoclave, o frasco foi selado e transferido para a coifa BL2 e deixado para esfriar até a temperatura ambiente. Este recipiente foi testado para esterilidade antes da montagem da vacina.

Água Estéril

Água estéril foi preparada enchendo parcialmente frascos limpos Pyrex Media Bottles com água DI. Os frascos foram em seguida autoclavados por 45 minutos, 121°C, e 124,1 kPa (18 psi). Na remoção do autoclave, os frascos foram selados enquanto ainda quentes e deixados para esfriar em uma coifa. Antes da montagem da vacina um frasco de água estéril foi selecionado e submetido a prova da esterilidade conforme descrito abaixo.

Ensaio da Esterilidade.

Para assegurar a axenicidade das vacinas formuladas, todas as matérias-primas estéreis usadas na formulação, e as próprias vacinas formuladas, foram testadas para esterilidade.

Preparação de Ágar e Placas de Petri

Ágar de Bennett foi usado para a laminação de esterilidade. Ágar de Bennett foi preparado na seguinte maneira:

	<u>Ágar de Bennett</u>	<u>Quantidade</u>
	Extrato de Levedura	1,0 g/L
5	Extrato de Carne	1,0 g/L
	NZ Amina A	2,0 g/L
	Glicose	10,0 g/L
	Ágar	15,0 g/L
	Água DI	1,0 L

- 10 Aquecer sobre uma placa de agitação até o ágar ser dissolvido.
(Cobrando ligeiramente com folha fina de metal facilitará o aquecimento)

Encher os frascos cerca da metade, tampar frouxamente e autoclavar no ciclo líquido por 20 minutos, 121°C e 18 psi.

- 15 Placas de Petri de 100X15 mm foram enchidas até aproximadamente $\frac{3}{4}$ repletas com ágar de Bennett e foram deixadas para solidificar. As placas foram preparadas no mínimo quatro dias antes da experimentação para assegurar que estivessem estéreis antes de usar na experimentação.

Laminação de Matérias-primas e Vacinas Formuladas

- 20 Uma alça inoculante estéril de 10 µl foi usada para obter uma amostra do ingrediente bruto ou da vacina formulada sendo testada. O método de faixa de quadrante, uma técnica comum em microbiologia usada para obter isolados de colônia única, foi usado para laminar a amostra. Em um esforço para aumentar a sensibilidade do teste, uma segunda placa foi estabelecida com uma amostra de 200 µl. A amostra foi uniformemente es-
- 25 palhada através da placa com um espalhador celular estéril. As placas foram incubadas de cabeça para baixo dentro de uma incubadora a 30°C. Foram verificadas diariamente (exceto nos fins de semana) para quaisquer sinais de crescimento de contaminantes. Uma vez que as placas tinham permanecido limpas por duas semanas, a matéria-prima laminada foi considerada
- 30 estéril e pronta para uso.

Duas a três semanas antes da data de início do estudo as vacinas foram reunidas. A Tabela 18 mostra os cálculos para este lote de vacina

e os volumes de cada componente usado. A vacina foi reunida primeiro pipetando a água e a solução de adjuvante requerida para dentro de um frasco plástico estéril de 250 ml estéril. O frasco foi fechado e agitado para misturar os dois componentes. O frasco foi em seguida aberto e o antígeno foi adicionado por pipeta. O frasco foi novamente fechado e agitado para misturar completamente os componentes. A vacina final foi transferida para dentro de frascos estéreis contendo ou 10 ou 25 ml de vacina. As rolhas do septo foram colocadas dentro dos frascos usando um par de fórceps autoclavados para manusear a rolha. Uma vez que a rolha estava assentada sobre os frascos, estes foram selados com um selo de alumínio plissado. Os frascos foram etiquetados com a etiqueta previamente aprovada e armazenados dentro do refrigerador e mantidos em 2 a 7°C antes da expedição. Um frasco de cada cada vacina foi testado para esterilidade conforme descrito in the Sterility Testing seção. Depois do experimento de esterilidade ser completado, a amostra de vacina foi avaliada para pH, densidade, e Osmolalidade. Os resultados do experimento de propriedade física são mostrados na Tabela 19.

Vacinação de cavalos.

Quarenta e seis cavalos negativos para anticorpos neutralizantes séricos WNV (machos e fêmeas; de 6 a 12 meses de idade; títulos de WNV SN $\leq$ 1:20) foram adquiridos de um fornecedor externo. Os cavalos foram misturados em uma instalação à ensaio de mosquito e foram identificados individualmente por microchips implantados. No Dia 0 do Estudo, foi colhida uma amostra de sangue de todos os cavalos e em seguida todos os cavalos receberam 1 mL do tratamento prescrito conforme descrito na Tabela 17. As vacinações foram administrados por via intramuscular sobre o lado esquerdo do pescoço. O sangue foi processado em soro e armazenado a -28,9°C (-20°F) para análise posterior. Os cavalos foram monitorados diariamente para quaisquer sinais de reatividade adversa à vacinação. Não foram observadas reações.

No Dia 14 do Estudo, uma amostra de sangue foi colhida de todos os cavalos e em seguida todos os cavalos receberam 1 mL do trata-

mento prescrito conforme descrito na Tabela 17. As vacinações foram liberadas por via intramuscular sobre o lado direito do pescoço. O sangue foi processado em soro e armazenado a -28,9°C para análise posterior. Os cavalos foram monitorados diariamente para quaisquer sinais de reatividade adversa à vacinação. Não foram observadas reações.

Além das amostras de sangue coletadas nos Dias 0 e 14 do Estudo, também foram coletadas amostras de sangue de todos os cavalos nos Dias 7, 21, 28, 35, 42 e 49 do Estudo. Todas as amostras de sangue foram coletadas da veia jugular e aproximadamente 12 mL de sangue foi coletado em cada dia da amostra. Todo o sangue foram processados em soro e armazenado a -28,9°C para análise posterior.

Ensaio de Neutralização Sérica do WNV.

Todas as ensaios de neutralização sérica foram realizadas em um laboratório BSL-3. Os títulos de neutralização foram medidos em uma ensaio sérica variável, de vírus constante, sobre células VERO. Soro inativado por calor (30 minutos a 56°C) foi adequadamente diluído em uma placa de microtitulação, cinco poços por diluição, em DMEM com 2% de soro bovino fetal (FBS). Vírus WNV do estoque, um isolado de centrocercos do Wyoming, foi diluído para obter uma faixa de 100 a 300 TCID₅₀/25 µl no mesmo meio de diluição e um volume igual foi adicionada ao soro em cada poço. As placas foram incubadas por 60 minutos para permitir ao soro neutralizar o vírus, e em seguida 20.000 a 30.000 células VERO em 150 µl de meio foram adicionadas a cada poço para detectar vírus não-neutralizado. Controles (soros positivos conhecidos, poços não infectadas, e titulação do vírus) foram incluídos sobre uma placa separada. As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 4 a 7 dias e observadas microscopicamente em intervalos para a presença de efeito citopático (CPE). O controle celular não infectado não teve CPE. Os títulos de neutralização das amostras de teste foram expressadas como a recíproca da diluição final do soro presente nas misturas de soro e vírus na diluição onde 50% das células foram não infectadas. A retrotitulação de WNV estava dentro da faixa de 50 a 300. Soro controle positivo anti-WNV equino teve uma faixa de título de 150 a 450. Para calcular o

título médio geométrico (GMT), títulos ≤ 2 foram atribuídos 2 e títulos ≥ 356 foram atribuídos 356. Soros de cavalos vacinados tiveram títulos de neutralização conforme mostrado na Tabela 20. Não foram gerados títulos de neutralizantes séricos em cavalos recebendo as vacinas de controle celular NT-1 com adjuvante (Grupos 1 e 2). Cavalos recebendo a proteína E de WNV com adjuvante (Grupos 3, 4, 5 e 6) gerados de WNV anticorpo neutralizante (Tabela 20). É evidente que a proteína E de WNV produzida por células de planta foi altamente imunogênica e possui no mínimo um epítipo requerido para produzir anticorpos neutralizantes.

No Dia 101 do Estudo, todos os cavalos dos Grupos 1 e 3 e 2 cavalos do Grupo 2 (total de 15 cavalos) foram remetidos para uma instalação BSL-3 para estímulo. No Dia do Estudo 105 todos os cavalos foram estimulados pela inoculação intratecal de 107.000 unidades formadoras de placa (pfu) WNV NY99 em 1 mL de PBS. Os cavalos foram monitorados duas vezes ao dia por 14 dias e amostras de sangue foram colhidas duas vezes ao dia no dia 1 ao 6 e uma vez ao dia no dia 0 (dia do estímulo), 7, 10 e 14 pós-estímulo para processamento no soro e avaliação da viremia. Os cavalos demonstrando graves sintomas neurológicos durante o período de observação de 14 dias pós-estímulo foram humanamente sacrificados por uma overdose de barbiturato. Todos os cavalos restantes foram sacrificados ao final do estudo (Dia 14 a 17). Os cavalos foram considerados como estando infectados com WNV e não-protegidos se tiveram 2 culturas positivas consecutivas das amostras de sangue colhidas nos dias 0 a 7, 10 e 14 pós-estímulo. Adicionalmente, foi avaliada a proteção contra doença por monitoramento clínico duas vezes ao dia inclusive medição da temperatura. Foi realizada histopatologia sobre seções do cérebro de todos os cavalos.

Os dados da viremia são apresentados na Tabela 21. Todos os cavalos controle não vacinados (Grupo 1 e 2) foram virêmicos por no mínimo 2 dias consecutivos durante o período pós-estímulo. Na viremia foi detectada em qualquer dos cavalos vacinados durante o período de monitoramento pós-estímulo.

Os dados da temperatura são apresentados na Tabela 22. Os

cavalos foram considerados como sendo febris se 2 medições de temperatura consecutivas foram maiores ou iguais a 39,17°C (102,5°F). Quatro dos cinco cavalos controle não vacinados (Grupo 1 e 2) foram febris durante o período pós-estímulo. Um dos cavalos controle não foi considerado como sendo febril com base no critério de 2 medições de temperatura consecutivas de $\geq 39,17^{\circ}\text{C}$ (102,5°F); no entanto, este cavalo teve vários eventos febris independentes e foi sacrificado devido a graves sinais clínicos antes do fim do período de observação do estímulo. Nove dos 10 cavalos vacinados no Grupo 3 estavam afebris durante o período pós-estímulo. Um dos 10 cavalos vacinados (Grupo 3) teve 2 medições de temperatura consecutivas $\geq 39,17^{\circ}\text{C}$ (102,5°F).

Dados de avaliação clínica são apresentados na Tabela 23. Os cavalos foram monitorados duas vezes ao dia para sinais clínicos de doença inclusive letargia, depressão, tremores, diminuição do apetite, hipersensibilidade, relutância para mover, moribundo. Se não foram observados sinais de doença clínica e os cavalos estavam clinicamente normais eles foram avaliados como sendo espertos e responsivos (BAR). Os cavalos foram considerados como tendo sinais clínicos de WNV se tiveram 2 avaliações consecutivas onde foram observados sinais clínicos de doença. Três dos cinco cavalos controle não vacinados (Grupo 1 e 2) demonstraram sinais clínicos de doença. A gravidade destes sinais clínicos progrediu significativamente e estes 3 cavalos foram humanamente sacrificados durante o período pós-estímulo. Dois dos 5 cavalos controle não demonstraram sinais clínicos de doença. Nove dos 10 cavalos vacinados no Grupo 3 foram assintomáticos durante o período pós-estímulo. Um dos 10 cavalos vacinados (Grupo 3) teve 2 avaliações consecutivas onde foram evidentes sinais clínicos brandos de doença. Estes sinais clínicos não progrediram e o cavalo retornou à avaliação BAR.

Foi realizado exame histológico de 2 seções do cérebro (através da ponte e através da medula média) em cada cavalo. Os resultados destes exames histológicos são apresentados na Tabela 24. A histologia foi considerada como sendo anormal se ambas as seções apresentaram sinais de

alterações brandas, moderadas ou graves. Cinco dos cinco cavalos controle não vacinados (Grupo 1 e 2) foram histologicamente anormais com ambas as seções examinadas tendo alterações histológicas moderadas a graves associadas com encefalite. Três dos 10 cavalos vacinados no Grupo 3 tiveram histologia anormal das 2 seções cerebrais examinadas. Em 2 destes cavalos, estes achados anormais foram brandos em ambas as seções examinadas. Um dos cavalos teve encefalite moderada observada. Não foram evidentes lesões graves. Sete dos 10 cavalos vacinados tiveram histologia normal ou somente alterações histológicas brandas em somente uma das seções examinadas. Estas alterações unilaterais brandas não foram consideradas como sendo consistentes com infecção por WNV.

Deve ser entendido que os exemplos e modalidades descritos aqui, neste pedido de patente, são para fins ilustrativos somente e que várias modificações ou alterações à luz dos mesmos serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas dentro do espírito e do âmbito deste pedido. Além disso, quaisquer elementos ou limitações de qualquer invenção ou modalidade da mesma revelados aqui, neste pedido de patente, podem ser combinados com quaisquer e/ou todos outros elementos ou limitações (individualmente ou em qualquer combinação) ou qualquer outra invenção ou modalidade da mesma revelados aqui, neste pedido de patente, e todas as referidas combinações são contemplados com o âmbito da invenção sem limitação a estes.

Tabela 1. Distribuição de códons em regiões codificantes de proteína do gene do tabaco					
Aminoáci-do	Códon	% de Uso do Tabaco	Aminoáci-do	Códon	% de Uso do Tabaco
ALA (A)	GCA	31,0	LEU (L)	CTA	10,5
	GCC	17,3		CTC	13,0
	GCG	8,1		CTG	11,2
	GCT	43,6		CTT	25,9
ARG (R)	AGA	31,7		TTA	15,3
	AGG	24,6		TTG	24,0
	CGA	11,9	LYS (K)	AAA	50,0
	CGC	8,1		AAG	50,0
	CGG	7,7	MET (M)	ATG	100,0
	CGT	16,0		TTC	41,9
ASN (N)	AAC	39,4	PHE (F)	TTT	58,1
	AAT	60,6		CCA	38,9
ASP (D)	GAC	31,1		CCC	13,6
	GAT	68,9		CCG	10,0
CYS (C)	TGC	42,6	PRO (P)	CCT	37,5
	TGT	57,4		AGC	12,5
END	TAA	42,6		AGT	17,3
	TAG	19,6		TCA	22,6
	TGA	37,8		TCC	14,1
	CAA	58,9	SER (S)	TCG	7,2
GLN (Q)	CAG	41,1		TCT	26,2
	GAA	55,7	THR (T)	ACA	32,7
GLU (E)	GAG	44,3		ACC	19,1
	GGA	34,6		ACG	8,8
	GGC	16,2		ACT	39,4
	GGG	15,4	TRP (W)	TGG	100,0
	GGT	33,7		TAC	41,4
HIS (H)	CAC	38,3	TYR (Y)	TAT	58,6
	CAT	61,7		GTA	18,3
ILE (I)	ATA	25,8		GTC	17,0
	ATC	24,6		GTG	24,3
	ATT	49,6		GTT	40,4

Tabela 2. Comparações da composição de códons de regiões codificantes de peptídeo M e E da sequência de WNV nativo (bases 277-2004 de SEQ ID NO: 1) e duas versões de gene otimizado para tabaco (SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7).

Amino-ácido	Códon	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	Amino-ácido	Códon	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
ALA (A)	GCA	10	19	17	LEU (L)	CTA	7	0	0
	GCC	15	10	10		CTC	10	8	8
	GCG	6	0	0		CTG	9	7	7
	GCT	21	23	25		CTT	5	15	16
ARG (R)	AGA	10	10	8	LYS (K)	TTA	1	9	9
	AGG	5	7	6		TTG	22	15	14
	CGA	0	2	2		AAA	10	18	14
	CGC	2	0	0	MET (M)	AAG	20	12	16
	CGG	1	0	0		ATG	15	15	15
	CGT	3	2	5	PHE (F)	TTC	11	10	10
ASN (N)	AAC	15	7	8		TTT	13	14	14
	AAT	6	14	13	PRO (P)	CCA	7	8	8
ASP (D)	GAC	16	8	7		CCC	2	3	3
	GAT	5	13	14		CCG	1	0	0
CYS (C)	TGC	9	5	5	SER (S)	CCT	9	8	8
	TGT	3	7	7		AGC	13	6	6
END	TAA					AGT	3	7	8
GLN (Q)	TAG				THR (T)	TCA	14	10	10
	TGA					TCC	5	7	8
	CAA	6	9	10		TCG	3	0	0
GLU (E)	CAG	9	6	5		TCT	5	13	11
	GAA	15	14	14		ACA	14	17	18
	GAG	10	11	11		ACC	13	11	10

Tabela 2. Comparações da composição de códons de regiões codificantes de peptídeo M e E da sequência de WNV nativo (bases 277-2004 de SEQ ID NO: 1) e duas versões de gene otimizado para tabaco (SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7).

GLY (G)	GGA	34	20	20	TRP (W)	ACG	9	0	0
	GGC	14	11	10		ACT	13	21	21
	GGG	8	7	9		TGG	12	12	12
	GGT	3	21	20		TAC	8	7	7
HIS (H) 14	CAC	8	4	5	TYR (Y)	TAT	6	7	7
	CAT	6	10	9		GTA	1	11	10
ILE (I)	ATA	5	5	6	VAL (V)	GTC	12	6	9
	ATC	9	5	6		GTG	32	11	14
	ATT	7	11	9		GTT	10	27	22

Tabela 3. Meio NT-1 B

Reagente	Por litro
Sais MS (10X)	100 ml
MES	0,5 g
Tiamina-HCl (1 mg/ml)	1 ml
Myo-inositol	100 mg
K ₂ HPO ₄	137,4 mg
2,4-D (10 mg/ml)	222 µl
Sacarose	30 g
pH até 5,7 ± 0,03	

Tabela 4. Sumário de rodadas de fermentação de reator de tanque agitado (STR).					
Evento	ID do Lote	Vaso fermentador	% de PCV da colheita	Volume da colheita (L)	Recuperação volumétrica (mg de antígeno /L de volume de trabalho)
1622-210δ	WNV S-RD05005	Biostat C20	50	9,9	1,846
1622-207δ	WNV S-RD05006	Biostat B10	38	9,3	1,574
1622-210	WNV S-RD05007	Bioflo 3000	56	9,8	1,997
1622-207	WNV S-RD05008	Biostat B10	36	9,3	1,645
1622-207	WNV S-RD05009	Biostat B10	38	9,4	1,492
1702-525δ	WNV S-RD05010	Biostat KB10	41	9,5	0,966

δ = Todos os 1622 eventos foram transformados com pDAB2475, codificando as proteínas ME, ao passo que todos os 1702 eventos foram transformados com pDAB2481, codificando as proteínas prME com sítio de glicosilação mutado com proteína E (prME(-)).

Tabela 5. Amostras de antígeno do Vírus West Nile recombinante produzido para o Estudo I.				
Grupo de tratamento, n = 5	Evento de cultura celular	Método do processo	Concentração de proteína E (mg)	No. de ID do Lote, rótulo do frasco
1	1622-207	PM7	3,38	SRD05005
2	1622-207	PM7	3,38	SRD05005
3	1622-207	PM3	0,71	SRD05006
4	1622-210	PM4	0,48	SRD05007
5	1622-210	PM2	0,51	SRD05008
6	1702-525	PM2 e PM3, juntos	0,93	SRD05009
7	1602-207	PM5	0,18	SRD05010
8	NT1 selvagem	PM2	0	SRD05011
9	NT1 selvagem	PM3	0	SRD05012
10	NT1 selvagem	PM4 Ψ	0	SRD05013 Ψ
11	NT1 selvagem	PM7	0	SRD05014
12	WNV Inativado	Blitvich <i>et al</i> (3)	2,72 μ g/100 μ l	SRD05015
13	PBS	NA	0	SRD05016

Ψ = amostra omitida devido a insuficiente massa de amostra disponível depois da liofilização.

Tabela 6. Amostras de antígeno do Vírus West Nile recombinante formulado para o Estudo I.							
Grupo de tratamento, n = 5	Evento de cultura celular	Método do Processo	Concentração de proteína E (mg)	no. de ID do Lote, rótulo do frasco	Água adicionada (ml)	Capacidade para Reidratar	Dose Aprox. de proteína E por camundongo (µg)
1	1622-207	PM7	3,38	SRD05005	-	Não a 100 µg da dose desejada	-
2	1622-207	PM7	3,38	SRD05005	6,8	Facilmente	50
3	1622-207	PM3	0,71	SRD05006	14,2	Insolúvel	-
4	1622-210	PM4	0,48	SRD05007	24	Sim	3
5	1622-210	PM2	0,51	SRD05008	10,2	Sim	5
6	1702-525	PM2 e PM3, juntos	0,93	SRD05009	21,6	Sim	4
7	1602-207	PM5	0,18	SRD05010	3,6	Sim	5
8	NT1 selva-gem	PM2	0	SRD05011	1,02	Sim	0
9	NT1 selva-gem	PM3	0	SRD05012	1,22	Sim	0
11	NT1 selva-gem	PM7	0	SRD05014	3,38	Sim	0
12	WNV Inativado	Blitvich <i>et al</i> (3)	2,72 µg/100 µl	SRD05015	-	Sim	2,72
13	PBS	NA	0	SRD05016	0	Sim	0

Tabela 7. Títulos de neutralização de WNV produzidos a partir de vacinação com antígeno de WNV produzido por célula de planta, Estudo I.						
Grupo de tratamento	Camundongo nº 1	Camundongo nº 2	Camundongo nº 3	Camundongo nº 4	Camundongo nº 5	Título Médio
2	1280	1920	>2560	1920	>2560	>2560
4	1280	960	640	1280	ND	1040
5	>2560	>2560	1280	1920	80	656
6	120	480	40	<20	240	176
7	480	480	1280	320	1280	768
8	<20	<20	<20	<20	<20	<20
9	<20	<20	<20	<20	<20	<20
11	<20	<20	<20	<20	<20	<20
12	>20480	>20480	>20480	>20480	>20480	>20480
13	<20	<20	<20	<20	<20	<20

Tabela 8. Grupos de tratamento para segundo estudo com camundongo, testando múltiplas doses e múltiplos adjuvantes (CFA, adjuvante completo de Freund; IFA, adjuvante incompleto de Freund; OW, óleo em água)				
GRUPO	TRATAMENTO	DOSE DE ANTÍGENO	ADJUVANTE	Nº de ANIMAIS
1	Controle de célula vegetal NT-1	NA	Titer-Max	5
2	Vacina de célula de planta (evento 1622-207)	25 μ	CFA IFA	5
3	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	25 μ g	Titer-Max	10
4	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	5 μ g	Titer-Max	10
5	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	0,5 μ g	Titer-Max	10
6	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	25 μ g	Carbopol	10
7	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	5 μ g	Carbopol	10

Tabela 8. Grupos de tratamento para segundo estudo com camundongo, testando múltiplas doses e múltiplos adjuvantes (CFA, adjuvante completo de Freund; IFA, adjuvante incompleto de Freund; OW, óleo em água)				
8	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	0,5 μ g	Carbopol	10
9	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	25 μ g	Carbigen	10
10	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	5 μ g	Carbigen	10
11	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	0,5 μ g	Carbigen	10
12	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	25 μ g	OW	10
13	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	5 μ g	OW	10
14	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	0,5 μ g	OW	10

Tabela 8. Grupos de tratamento para segundo estudo com camundongo, testando múltiplas doses e múltiplos adjuvantes (CFA, adjuvante completo de Freund; IFA, adjuvante incompleto de Freund; OW, óleo em água)				
15	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	25 μg	Polygen	10
16	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	5 μg	Polygen	10
17	Vacina de WNV produzida por célula de planta (evento 1622-207)	0,5 μg	Polygen	10

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
5	1 e 664	Y+4	53	1 e 616	Y+52
6	1 e 663	Y+5	54	1 e 615	Y+53
7	1 e 662	Y+6	55	1 e 614	Y+54
8	1 e 661	Y+7	56	1 e 613	Y+55
9	1 e 660	Y+8	57	1 e 612	Y+56
10	1 e 659	Y+9	58	1 e 611	Y+57
11	1 e 658	Y+10	59	1 e 610	Y+58
12	1 e 657	Y+11	60	1 e 609	Y+59
13	1 e 656	Y+12	61	1 e 608	Y+60
14	1 e 655	Y+13	62	1 e 607	Y+61
15	1 e 654	Y+14	63	1 e 606	Y+62
16	1 e 653	Y+15	64	1 e 605	Y+63
17	1 e 652	Y+16	65	1 e 604	Y+64
18	1 e 651	Y+17	66	1 e 603	Y+65
19	1 e 650	Y+18	67	1 e 602	Y+66
20	1 e 649	Y+19	68	1 e 601	Y+67
21	1 e 648	Y+20	69	1 e 600	Y+68
22	1 e 647	Y+21	70	1 e 599	Y+69
23	1 e 646	Y+22	71	1 e 598	Y+70
24	1 e 645	Y+23	72	1 e 597	Y+71
25	1 e 644	Y+24	73	1 e 596	Y+72
26	1 e 643	Y+25	74	1 e 595	Y+73
27	1 e 642	Y+26	75	1 e 594	Y+74
28	1 e 641	Y+27	76	1 e 593	Y+75
29	1 e 640	Y+28	77	1 e 592	Y+76
30	1 e 639	Y+29	78	1 e 591	Y+77
31	1 e 638	Y+30	79	1 e 590	Y+78
32	1 e 637	Y+31	80	1 e 589	Y+79
33	1 e 636	Y+32	81	1 e 588	Y+80
34	1 e 635	Y+33	82	1 e 587	Y+81
35	1 e 634	Y+34	83	1 e 586	Y+82
36	1 e 633	Y+35	84	1 e 585	Y+83
37	1 e 632	Y+36	85	1 e 584	Y+84
38	1 e 631	Y+37	86	1 e 583	Y+85
39	1 e 630	Y+38	87	1 e 582	Y+86
40	1 e 629	Y+39	88	1 e 581	Y+87
41	1 e 628	Y+40	89	1 e 580	Y+88
42	1 e 627	Y+41	90	1 e 579	Y+89
43	1 e 626	Y+42	91	1 e 578	Y+90
44	1 e 625	Y+43	92	1 e 577	Y+91
45	1 e 624	Y+44	93	1 e 576	Y+92
46	1 e 623	Y+45	94	1 e 575	Y+93

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
47	1 e	622	Y+46	95	1 e	574	Y+94
48	1 e	621	Y+47	96	1 e	573	Y+95
49	1 e	620	Y+48	97	1 e	572	Y+96
50	1 e	619	Y+49	98	1 e	571	Y+97
51	1 e	618	Y+50	99	1 e	570	Y+98
52	1 e	617	Y+51	100	1 e	569	Y+99
101	1 e	568	Y+100	149	1 e	520	Y+148
102	1 e	567	Y+101	150	1 e	519	Y+149
103	1 e	566	Y+102	151	1 e	518	Y+150
104	1 e	565	Y+103	152	1 e	517	Y+151
105	1 e	564	Y+104	153	1 e	516	Y+152
106	1 e	563	Y+105	154	1 e	515	Y+153
107	1 e	562	Y+106	155	1 e	514	Y+154
108	1 e	561	Y+107	156	1 e	513	Y+155
109	1 e	560	Y+108	157	1 e	512	Y+156
110	1 e	559	Y+109	158	1 e	511	Y+157
111	1 e	558	Y+110	159	1 e	510	Y+158
112	1 e	557	Y+111	160	1 e	509	Y+159
113	1 e	556	Y+112	161	1 e	508	Y+160
114	1 e	555	Y+113	162	1 e	507	Y+161
115	1 e	554	Y+114	163	1 e	506	Y+162
116	1 e	553	Y+115	164	1 e	505	Y+163
117	1 e	552	Y+116	165	1 e	504	Y+164
118	1 e	551	Y+117	166	1 e	503	Y+165
119	1 e	550	Y+118	167	1 e	502	Y+166
120	1 e	549	Y+119	168	1 e	501	Y+167
121	1 e	548	Y+120	169	1 e	500	Y+168
122	1 e	547	Y+121	170	1 e	499	Y+169
123	1 e	546	Y+122	171	1 e	498	Y+170
124	1 e	545	Y+123	172	1 e	497	Y+171
125	1 e	544	Y+124	173	1 e	496	Y+172
126	1 e	543	Y+125	174	1 e	495	Y+173
127	1 e	542	Y+126	175	1 e	494	Y+174
128	1 e	541	Y+127	176	1 e	493	Y+175
129	1 e	540	Y+128	177	1 e	492	Y+176
130	1 e	539	Y+129	178	1 e	491	Y+177
131	1 e	538	Y+130	179	1 e	490	Y+178
132	1 e	537	Y+131	180	1 e	489	Y+179
133	1 e	536	Y+132	181	1 e	488	Y+180
134	1 e	535	Y+133	182	1 e	487	Y+181
135	1 e	534	Y+134	183	1 e	486	Y+182
136	1 e	533	Y+135	184	1 e	485	Y+183
137	1 e	532	Y+136	185	1 e	484	Y+184

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
138	1 e	531	Y+137
139	1 e	530	Y+138
140	1 e	529	Y+139
141	1 e	528	Y+140
142	1 e	527	Y+141
143	1 e	526	Y+142
144	1 e	525	Y+143
145	1 e	524	Y+144
146	1 e	523	Y+145
147	1 e	522	Y+146
148	1 e	521	Y+147
197	1 e	472	Y+196
198	1 e	471	Y+197
199	1 e	470	Y+198
200	1 e	469	Y+199
201	1 e	468	Y+200
202	1 e	467	Y+201
203	1 e	466	Y+202
204	1 e	465	Y+203
205	1 e	464	Y+204
206	1 e	463	Y+205
207	1 e	462	Y+206
208	1 e	461	Y+207
209	1 e	460	Y+208
210	1 e	459	Y+209
211	1 e	458	Y+210
212	1 e	457	Y+211
213	1 e	456	Y+212
214	1 e	455	Y+213
215	1 e	454	Y+214
216	1 e	453	Y+215
217	1 e	452	Y+216
218	1 e	451	Y+217
219	1 e	450	Y+218
220	1 e	449	Y+219
221	1 e	448	Y+220
222	1 e	447	Y+221
223	1 e	446	Y+222
224	1 e	445	Y+223
225	1 e	444	Y+224
226	1 e	443	Y+225
227	1 e	442	Y+226
228	1 e	441	Y+227

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
186	1 e	483	Y+185
187	1 e	482	Y+186
188	1 e	481	Y+187
189	1 e	480	Y+188
190	1 e	479	Y+189
191	1 e	478	Y+190
192	1 e	477	Y+191
193	1 e	476	Y+192
194	1 e	475	Y+193
195	1 e	474	Y+194
196	1 e	473	Y+195
245	1 e	424	Y+244
246	1 e	423	Y+245
247	1 e	422	Y+246
248	1 e	421	Y+247
249	1 e	420	Y+248
250	1 e	419	Y+249
251	1 e	418	Y+250
252	1 e	417	Y+251
253	1 e	416	Y+252
254	1 e	415	Y+253
255	1 e	414	Y+254
256	1 e	413	Y+255
257	1 e	412	Y+256
258	1 e	411	Y+257
259	1 e	410	Y+258
260	1 e	409	Y+259
261	1 e	408	Y+260
262	1 e	407	Y+261
263	1 e	406	Y+262
264	1 e	405	Y+263
265	1 e	404	Y+264
266	1 e	403	Y+265
267	1 e	402	Y+266
268	1 e	401	Y+267
269	1 e	400	Y+268
270	1 e	399	Y+269
271	1 e	398	Y+270
272	1 e	397	Y+271
273	1 e	396	Y+272
274	1 e	395	Y+273
275	1 e	394	Y+274
276	1 e	393	Y+275

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoáci- dos)	Y é qualquer nú- mero inteiro sele- cionado entre, e incluindo:		Z
229	1 e	440	Y+228
230	1 e	439	Y+229
231	1 e	438	Y+230
232	1 e	437	Y+231
233	1 e	436	Y+232
234	1 e	435	Y+233
235	1 e	434	Y+234
236	1 e	433	Y+235
237	1 e	432	Y+236
238	1 e	431	Y+237
239	1 e	430	Y+238
240	1 e	429	Y+239
241	1 e	428	Y+240
242	1 e	427	Y+241
243	1 e	426	Y+242
244	1 e	425	Y+243
293	1 e	376	Y+292
294	1 e	375	Y+293
295	1 e	374	Y+294
296	1 e	373	Y+295
297	1 e	372	Y+296
298	1 e	371	Y+297
299	1 e	370	Y+298
300	1 e	369	Y+299
301	1 e	368	Y+300
302	1 e	367	Y+301
303	1 e	366	Y+302
304	1 e	365	Y+303
305	1 e	364	Y+304
306	1 e	363	Y+305
307	1 e	362	Y+306
308	1 e	361	Y+307
309	1 e	360	Y+308
310	1 e	359	Y+309
311	1 e	358	Y+310
312	1 e	357	Y+311
313	1 e	356	Y+312
314	1 e	355	Y+313
315	1 e	354	Y+314
316	1 e	353	Y+315
317	1 e	352	Y+316
318	1 e	351	Y+317
319	1 e	350	Y+318

Extensão do Frag-mento (aminoáci- dos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e inclu- do:		Z
277	1 e	392	Y+276
278	1 e	391	Y+277
279	1 e	390	Y+278
280	1 e	389	Y+279
281	1 e	388	Y+280
282	1 e	387	Y+281
283	1 e	386	Y+282
284	1 e	385	Y+283
285	1 e	384	Y+284
286	1 e	383	Y+285
287	1 e	382	Y+286
288	1 e	381	Y+287
289	1 e	380	Y+288
290	1 e	379	Y+289
291	1 e	378	Y+290
292	1 e	377	Y+291
341	1 e	328	Y+340
342	1 e	327	Y+341
343	1 e	326	Y+342
344	1 e	325	Y+343
345	1 e	324	Y+344
346	1 e	323	Y+345
347	1 e	322	Y+346
348	1 e	321	Y+347
349	1 e	320	Y+348
350	1 e	319	Y+349
351	1 e	318	Y+350
352	1 e	317	Y+351
353	1 e	316	Y+352
354	1 e	315	Y+353
355	1 e	314	Y+354
356	1 e	313	Y+355
357	1 e	312	Y+356
358	1 e	311	Y+357
359	1 e	310	Y+358
360	1 e	309	Y+359
361	1 e	308	Y+360
362	1 e	307	Y+361
363	1 e	306	Y+362
364	1 e	305	Y+363
365	1 e	304	Y+364
366	1 e	303	Y+365
367	1 e	302	Y+366

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
320	1 e 349	Y+319	368	1 e 301	Y+367
321	1 e 348	Y+320	369	1 e 300	Y+368
322	1 e 347	Y+321	370	1 e 299	Y+369
323	1 e 346	Y+322	371	1 e 298	Y+370
324	1 e 345	Y+323	372	1 e 297	Y+371
325	1 e 344	Y+324	373	1 e 296	Y+372
326	1 e 343	Y+325	374	1 e 295	Y+373
327	1 e 342	Y+326	375	1 e 294	Y+374
328	1 e 341	Y+327	376	1 e 293	Y+375
329	1 e 340	Y+328	377	1 e 292	Y+376
330	1 e 339	Y+329	378	1 e 291	Y+377
331	1 e 338	Y+330	379	1 e 290	Y+378
332	1 e 337	Y+331	380	1 e 289	Y+379
333	1 e 336	Y+332	381	1 e 288	Y+380
334	1 e 335	Y+333	382	1 e 287	Y+381
335	1 e 334	Y+334	383	1 e 286	Y+382
336	1 e 333	Y+335	384	1 e 285	Y+383
337	1 e 332	Y+336	385	1 e 284	Y+384
338	1 e 331	Y+337	386	1 e 283	Y+385
339	1 e 330	Y+338	387	1 e 282	Y+386
340	1 e 329	Y+339	388	1 e 281	Y+387
389	1 e 280	Y+388	437	1 e 232	Y+436
390	1 e 279	Y+389	438	1 e 231	Y+437
391	1 e 278	Y+390	439	1 e 230	Y+438
392	1 e 277	Y+391	440	1 e 229	Y+439
393	1 e 276	Y+392	441	1 e 228	Y+440
394	1 e 275	Y+393	442	1 e 227	Y+441
395	1 e 274	Y+394	443	1 e 226	Y+442
396	1 e 273	Y+395	444	1 e 225	Y+443
397	1 e 272	Y+396	445	1 e 224	Y+444
398	1 e 271	Y+397	446	1 e 223	Y+445
399	1 e 270	Y+398	447	1 e 222	Y+446
400	1 e 269	Y+399	448	1 e 221	Y+447
401	1 e 268	Y+400	449	1 e 220	Y+448
402	1 e 267	Y+401	450	1 e 219	Y+449
403	1 e 266	Y+402	451	1 e 218	Y+450
404	1 e 265	Y+403	452	1 e 217	Y+451
405	1 e 264	Y+404	453	1 e 216	Y+452
406	1 e 263	Y+405	454	1 e 215	Y+453
407	1 e 262	Y+406	455	1 e 214	Y+454
408	1 e 261	Y+407	456	1 e 213	Y+455
409	1 e 260	Y+408	457	1 e 212	Y+456
410	1 e 259	Y+409	458	1 e 211	Y+457

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
411	1 e 258	Y+410	459	1 e 210	Y+458
412	1 e 257	Y+411	460	1 e 209	Y+459
413	1 e 256	Y+412	461	1 e 208	Y+460
414	1 e 255	Y+413	462	1 e 207	Y+461
415	1 e 254	Y+414	463	1 e 206	Y+462
416	1 e 253	Y+415	464	1 e 205	Y+463
417	1 e 252	Y+416	465	1 e 204	Y+464
418	1 e 251	Y+417	466	1 e 203	Y+465
419	1 e 250	Y+418	467	1 e 202	Y+466
420	1 e 249	Y+419	468	1 e 201	Y+467
421	1 e 248	Y+420	469	1 e 200	Y+468
422	1 e 247	Y+421	470	1 e 199	Y+469
423	1 e 246	Y+422	471	1 e 198	Y+470
424	1 e 245	Y+423	472	1 e 197	Y+471
425	1 e 244	Y+424	473	1 e 196	Y+472
426	1 e 243	Y+425	474	1 e 195	Y+473
427	1 e 242	Y+426	475	1 e 194	Y+474
428	1 e 241	Y+427	476	1 e 193	Y+475
429	1 e 240	Y+428	477	1 e 192	Y+476
430	1 e 239	Y+429	478	1 e 191	Y+477
431	1 e 238	Y+430	479	1 e 190	Y+478
432	1 e 237	Y+431	480	1 e 189	Y+479
433	1 e 236	Y+432	481	1 e 188	Y+480
434	1 e 235	Y+433	482	1 e 187	Y+481
435	1 e 234	Y+434	483	1 e 186	Y+482
436	1 e 233	Y+435	484	1 e 185	Y+483
485	1 e 184	Y+484	533	1 e 136	Y+532
486	1 e 183	Y+485	534	1 e 135	Y+533
487	1 e 182	Y+486	535	1 e 134	Y+534
488	1 e 181	Y+487	536	1 e 133	Y+535
489	1 e 180	Y+488	537	1 e 132	Y+536
490	1 e 179	Y+489	538	1 e 131	Y+537
491	1 e 178	Y+490	539	1 e 130	Y+538
492	1 e 177	Y+491	540	1 e 129	Y+539
493	1 e 176	Y+492	541	1 e 128	Y+540
494	1 e 175	Y+493	542	1 e 127	Y+541
495	1 e 174	Y+494	543	1 e 126	Y+542
496	1 e 173	Y+495	544	1 e 125	Y+543
497	1 e 172	Y+496	545	1 e 124	Y+544
498	1 e 171	Y+497	546	1 e 123	Y+545
499	1 e 170	Y+498	547	1 e 122	Y+546
500	1 e 169	Y+499	548	1 e 121	Y+547
501	1 e 168	Y+500	549	1 e 120	Y+548

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
502	1 e 167	Y+501	550	1 e 119	Y+549
503	1 e 166	Y+502	551	1 e 118	Y+550
504	1 e 165	Y+503	552	1 e 117	Y+551
505	1 e 164	Y+504	553	1 e 116	Y+552
506	1 e 163	Y+505	554	1 e 115	Y+553
507	1 e 162	Y+506	555	1 e 114	Y+554
508	1 e 161	Y+507	556	1 e 113	Y+555
509	1 e 160	Y+508	557	1 e 112	Y+556
510	1 e 159	Y+509	558	1 e 111	Y+557
511	1 e 158	Y+510	559	1 e 110	Y+558
512	1 e 157	Y+511	560	1 e 109	Y+559
513	1 e 156	Y+512	561	1 e 108	Y+560
514	1 e 155	Y+513	562	1 e 107	Y+561
515	1 e 154	Y+514	563	1 e 106	Y+562
516	1 e 153	Y+515	564	1 e 105	Y+563
517	1 e 152	Y+516	565	1 e 104	Y+564
518	1 e 151	Y+517	566	1 e 103	Y+565
519	1 e 150	Y+518	567	1 e 102	Y+566
520	1 e 149	Y+519	568	1 e 101	Y+567
521	1 e 148	Y+520	569	1 e 100	Y+568
522	1 e 147	Y+521	570	1 e 99	Y+569
523	1 e 146	Y+522	571	1 e 98	Y+570
524	1 e 145	Y+523	572	1 e 97	Y+571
525	1 e 144	Y+524	573	1 e 96	Y+572
526	1 e 143	Y+525	574	1 e 95	Y+573
527	1 e 142	Y+526	575	1 e 94	Y+574
528	1 e 141	Y+527	576	1 e 93	Y+575
529	1 e 140	Y+528	577	1 e 92	Y+576
530	1 e 139	Y+529	578	1 e 91	Y+577
531	1 e 138	Y+530	579	1 e 90	Y+578
532	1 e 137	Y+531	580	1 e 89	Y+579
581	1 e 88	Y+580	629	1 e 40	Y+628
582	1 e 87	Y+581	630	1 e 39	Y+629
583	1 e 86	Y+582	631	1 e 38	Y+630
584	1 e 85	Y+583	632	1 e 37	Y+631
585	1 e 84	Y+584	633	1 e 36	Y+632
586	1 e 83	Y+585	634	1 e 35	Y+633
587	1 e 82	Y+586	635	1 e 34	Y+634
588	1 e 81	Y+587	636	1 e 33	Y+635
589	1 e 80	Y+588	637	1 e 32	Y+636
590	1 e 79	Y+589	638	1 e 31	Y+637
591	1 e 78	Y+590	639	1 e 30	Y+638
592	1 e 77	Y+591	640	1 e 29	Y+639

Tabela 9. Fragmentos de SEQ ID NO: 5.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
593	1 e 76	Y+592	641	1 e 28	Y+640
594	1 e 75	Y+593	642	1 e 27	Y+641
595	1 e 74	Y+594	643	1 e 26	Y+642
596	1 e 73	Y+595	644	1 e 25	Y+643
597	1 e 72	Y+596	645	1 e 24	Y+644
598	1 e 71	Y+597	646	1 e 23	Y+645
599	1 e 70	Y+598	647	1 e 22	Y+646
600	1 e 69	Y+599	648	1 e 21	Y+647
601	1 e 68	Y+600	649	1 e 20	Y+648
602	1 e 67	Y+601	650	1 e 19	Y+649
603	1 e 66	Y+602	651	1 e 18	Y+650
604	1 e 65	Y+603	652	1 e 17	Y+651
605	1 e 64	Y+604	653	1 e 16	Y+652
606	1 e 63	Y+605	654	1 e 15	Y+653
607	1 e 62	Y+606	655	1 e 14	Y+654
608	1 e 61	Y+607	656	1 e 13	Y+655
609	1 e 60	Y+608	657	1 e 12	Y+656
610	1 e 59	Y+609	658	1 e 11	Y+657
611	1 e 58	Y+610	659	1 e 10	Y+658
612	1 e 57	Y+611	660	1 e 9	Y+659
613	1 e 56	Y+612	661	1 e 8	Y+660
614	1 e 55	Y+613	662	1 e 7	Y+661
615	1 e 54	Y+614	663	1 e 6	Y+662
616	1 e 53	Y+615	664	1 e 5	Y+663
617	1 e 52	Y+616	665	1 e 4	Y+664
618	1 e 51	Y+617	666	1 e 3	Y+665
619	1 e 50	Y+618	667	1 e 2	Y+666
620	1 e 49	Y+619			
621	1 e 48	Y+620			
622	1 e 47	Y+621			
623	1 e 46	Y+622			
624	1 e 45	Y+623			
625	1 e 44	Y+624			
626	1 e 43	Y+625			
627	1 e 42	Y+626			
628	1 e 41	Y+627			

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
5	1 e	690	Y+4	53	1 e	642	Y+52
6	1 e	689	Y+5	54	1 e	641	Y+53
7	1 e	688	Y+6	55	1 e	640	Y+54
8	1 e	687	Y+7	56	1 e	639	Y+55
9	1 e	686	Y+8	57	1 e	638	Y+56
10	1 e	685	Y+9	58	1 e	637	Y+57
11	1 e	684	Y+10	59	1 e	636	Y+58
12	1 e	683	Y+11	60	1 e	635	Y+59
13	1 e	682	Y+12	61	1 e	634	Y+60
14	1 e	681	Y+13	62	1 e	633	Y+61
15	1 e	680	Y+14	63	1 e	632	Y+62
16	1 e	679	Y+15	64	1 e	631	Y+63
17	1 e	678	Y+16	65	1 e	630	Y+64
18	1 e	677	Y+17	66	1 e	629	Y+65
19	1 e	676	Y+18	67	1 e	628	Y+66
20	1 e	675	Y+19	68	1 e	627	Y+67
21	1 e	674	Y+20	69	1 e	626	Y+68
22	1 e	673	Y+21	70	1 e	625	Y+69
23	1 e	672	Y+22	71	1 e	624	Y+70
24	1 e	671	Y+23	72	1 e	623	Y+71
25	1 e	670	Y+24	73	1 e	622	Y+72
26	1 e	669	Y+25	74	1 e	621	Y+73
27	1 e	668	Y+26	75	1 e	620	Y+74
28	1 e	667	Y+27	76	1 e	619	Y+75
29	1 e	666	Y+28	77	1 e	618	Y+76
30	1 e	665	Y+29	78	1 e	617	Y+77
31	1 e	664	Y+30	79	1 e	616	Y+78
32	1 e	663	Y+31	80	1 e	615	Y+79
33	1 e	662	Y+32	81	1 e	614	Y+80
34	1 e	661	Y+33	82	1 e	613	Y+81
35	1 e	660	Y+34	83	1 e	612	Y+82
36	1 e	659	Y+35	84	1 e	611	Y+83
37	1 e	658	Y+36	85	1 e	610	Y+84
38	1 e	657	Y+37	86	1 e	609	Y+85
39	1 e	656	Y+38	87	1 e	608	Y+86

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
40	1 e	655	Y+39	88	1 e	607	Y+87
41	1 e	654	Y+40	89	1 e	606	Y+88
42	1 e	653	Y+41	90	1 e	605	Y+89
43	1 e	652	Y+42	91	1 e	604	Y+90
44	1 e	651	Y+43	92	1 e	603	Y+91
45	1 e	650	Y+44	93	1 e	602	Y+92
46	1 e	649	Y+45	94	1 e	601	Y+93
47	1 e	648	Y+46	95	1 e	600	Y+94
48	1 e	647	Y+47	96	1 e	599	Y+95
49	1 e	646	Y+48	97	1 e	598	Y+96
50	1 e	645	Y+49	98	1 e	597	Y+97
51	1 e	644	Y+50	99	1 e	596	Y+98
52	1 e	643	Y+51	100	1 e	595	Y+99
101	1 e	594	Y+100	149	1 e	546	Y+148
102	1 e	593	Y+101	150	1 e	545	Y+149
103	1 e	592	Y+102	151	1 e	544	Y+150
104	1 e	591	Y+103	152	1 e	543	Y+151
105	1 e	590	Y+104	153	1 e	542	Y+152
106	1 e	589	Y+105	154	1 e	541	Y+153
107	1 e	588	Y+106	155	1 e	540	Y+154
108	1 e	587	Y+107	156	1 e	539	Y+155
109	1 e	586	Y+108	157	1 e	538	Y+156
110	1 e	585	Y+109	158	1 e	537	Y+157
111	1 e	584	Y+110	159	1 e	536	Y+158
112	1 e	583	Y+111	160	1 e	535	Y+159
113	1 e	582	Y+112	161	1 e	534	Y+160
114	1 e	581	Y+113	162	1 e	533	Y+161
115	1 e	580	Y+114	163	1 e	532	Y+162
116	1 e	579	Y+115	164	1 e	531	Y+163
117	1 e	578	Y+116	165	1 e	530	Y+164
118	1 e	577	Y+117	166	1 e	529	Y+165
119	1 e	576	Y+118	167	1 e	528	Y+166
120	1 e	575	Y+119	168	1 e	527	Y+167
121	1 e	574	Y+120	169	1 e	526	Y+168
122	1 e	573	Y+121	170	1 e	525	Y+169
123	1 e	572	Y+122	171	1 e	524	Y+170

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.							
Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
124	1 e	571	Y+123	172	1 e	523	Y+171
125	1 e	570	Y+124	173	1 e	522	Y+172
126	1 e	569	Y+125	174	1 e	521	Y+173
127	1 e	568	Y+126	175	1 e	520	Y+174
128	1 e	567	Y+127	176	1 e	519	Y+175
129	1 e	566	Y+128	177	1 e	518	Y+176
130	1 e	565	Y+129	178	1 e	517	Y+177
131	1 e	564	Y+130	179	1 e	516	Y+178
132	1 e	563	Y+131	180	1 e	515	Y+179
133	1 e	562	Y+132	181	1 e	514	Y+180
134	1 e	561	Y+133	182	1 e	513	Y+181
135	1 e	560	Y+134	183	1 e	512	Y+182
136	1 e	559	Y+135	184	1 e	511	Y+183
137	1 e	558	Y+136	185	1 e	510	Y+184
138	1 e	557	Y+137	186	1 e	509	Y+185
139	1 e	556	Y+138	187	1 e	508	Y+186
140	1 e	555	Y+139	188	1 e	507	Y+187
141	1 e	554	Y+140	189	1 e	506	Y+188
142	1 e	553	Y+141	190	1 e	505	Y+189
143	1 e	552	Y+142	191	1 e	504	Y+190
144	1 e	551	Y+143	192	1 e	503	Y+191
145	1 e	550	Y+144	193	1 e	502	Y+192
146	1 e	549	Y+145	194	1 e	501	Y+193
147	1 e	548	Y+146	195	1 e	500	Y+194
148	1 e	547	Y+147	196	1 e	499	Y+195
197	1 e	498	Y+196	245	1 e	450	Y+244
198	1 e	497	Y+197	246	1 e	449	Y+245
199	1 e	496	Y+198	247	1 e	448	Y+246
200	1 e	495	Y+199	248	1 e	447	Y+247
201	1 e	494	Y+200	249	1 e	446	Y+248
202	1 e	493	Y+201	250	1 e	445	Y+249
203	1 e	492	Y+202	251	1 e	444	Y+250
204	1 e	491	Y+203	252	1 e	443	Y+251
205	1 e	490	Y+204	253	1 e	442	Y+252
206	1 e	489	Y+205	254	1 e	441	Y+253
207	1 e	488	Y+206	255	1 e	440	Y+254

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
208	1 e	487	Y+207	256	1 e	439	Y+255
209	1 e	486	Y+208	257	1 e	438	Y+256
210	1 e	485	Y+209	258	1 e	437	Y+257
211	1 e	484	Y+210	259	1 e	436	Y+258
212	1 e	483	Y+211	260	1 e	435	Y+259
213	1 e	482	Y+212	261	1 e	434	Y+260
214	1 e	481	Y+213	262	1 e	433	Y+261
215	1 e	480	Y+214	263	1 e	432	Y+262
216	1 e	479	Y+215	264	1 e	431	Y+263
217	1 e	478	Y+216	265	1 e	430	Y+264
218	1 e	477	Y+217	266	1 e	429	Y+265
219	1 e	476	Y+218	267	1 e	428	Y+266
220	1 e	475	Y+219	268	1 e	427	Y+267
221	1 e	474	Y+220	269	1 e	426	Y+268
222	1 e	473	Y+221	270	1 e	425	Y+269
223	1 e	472	Y+222	271	1 e	424	Y+270
224	1 e	471	Y+223	272	1 e	423	Y+271
225	1 e	470	Y+224	273	1 e	422	Y+272
226	1 e	469	Y+225	274	1 e	421	Y+273
227	1 e	468	Y+226	275	1 e	420	Y+274
228	1 e	467	Y+227	276	1 e	419	Y+275
229	1 e	466	Y+228	277	1 e	418	Y+276
230	1 e	465	Y+229	278	1 e	417	Y+277
231	1 e	464	Y+230	279	1 e	416	Y+278
232	1 e	463	Y+231	280	1 e	415	Y+279
233	1 e	462	Y+232	281	1 e	414	Y+280
234	1 e	461	Y+233	282	1 e	413	Y+281
235	1 e	460	Y+234	283	1 e	412	Y+282
236	1 e	459	Y+235	284	1 e	411	Y+283
237	1 e	458	Y+236	285	1 e	410	Y+284
238	1 e	457	Y+237	286	1 e	409	Y+285
239	1 e	456	Y+238	287	1 e	408	Y+286
240	1 e	455	Y+239	288	1 e	407	Y+287
241	1 e	454	Y+240	289	1 e	406	Y+288
242	1 e	453	Y+241	290	1 e	405	Y+289
243	1 e	452	Y+242	291	1 e	404	Y+290

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.								
Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z		Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
244	1 e	451	Y+243		292	1 e	403	Y+291
293	1 e	402	Y+292		341	1 e	354	Y+340
294	1 e	401	Y+293		342	1 e	353	Y+341
295	1 e	400	Y+294		343	1 e	352	Y+342
296	1 e	399	Y+295		344	1 e	351	Y+343
297	1 e	398	Y+296		345	1 e	350	Y+344
298	1 e	397	Y+297		346	1 e	349	Y+345
299	1 e	396	Y+298		347	1 e	348	Y+346
300	1 e	395	Y+299		348	1 e	347	Y+347
301	1 e	394	Y+300		349	1 e	346	Y+348
302	1 e	393	Y+301		350	1 e	345	Y+349
303	1 e	392	Y+302		351	1 e	344	Y+350
304	1 e	391	Y+303		352	1 e	343	Y+351
305	1 e	390	Y+304		353	1 e	342	Y+352
306	1 e	389	Y+305		354	1 e	341	Y+353
307	1 e	388	Y+306		355	1 e	340	Y+354
308	1 e	387	Y+307		356	1 e	339	Y+355
309	1 e	386	Y+308		357	1 e	338	Y+356
310	1 e	385	Y+309		358	1 e	337	Y+357
311	1 e	384	Y+310		359	1 e	336	Y+358
312	1 e	383	Y+311		360	1 e	335	Y+359
313	1 e	382	Y+312		361	1 e	334	Y+360
314	1 e	381	Y+313		362	1 e	333	Y+361
315	1 e	380	Y+314		363	1 e	332	Y+362
316	1 e	379	Y+315		364	1 e	331	Y+363
317	1 e	378	Y+316		365	1 e	330	Y+364
318	1 e	377	Y+317		366	1 e	329	Y+365
319	1 e	376	Y+318		367	1 e	328	Y+366
320	1 e	375	Y+319		368	1 e	327	Y+367
321	1 e	374	Y+320		369	1 e	326	Y+368
322	1 e	373	Y+321		370	1 e	325	Y+369
323	1 e	372	Y+322		371	1 e	324	Y+370
324	1 e	371	Y+323		372	1 e	323	Y+371
325	1 e	370	Y+324		373	1 e	322	Y+372
326	1 e	369	Y+325		374	1 e	321	Y+373
327	1 e	368	Y+326		375	1 e	320	Y+374

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
328	1 e	367	Y+327	376	1 e	319	Y+375
329	1 e	366	Y+328	377	1 e	318	Y+376
330	1 e	365	Y+329	378	1 e	317	Y+377
331	1 e	364	Y+330	379	1 e	316	Y+378
332	1 e	363	Y+331	380	1 e	315	Y+379
333	1 e	362	Y+332	381	1 e	314	Y+380
334	1 e	361	Y+333	382	1 e	313	Y+381
335	1 e	360	Y+334	383	1 e	312	Y+382
336	1 e	359	Y+335	384	1 e	311	Y+383
337	1 e	358	Y+336	385	1 e	310	Y+384
338	1 e	357	Y+337	386	1 e	309	Y+385
339	1 e	356	Y+338	387	1 e	308	Y+386
340	1 e	355	Y+339	388	1 e	307	Y+387
389	1 e	306	Y+388	437	1 e	258	Y+436
390	1 e	305	Y+389	438	1 e	257	Y+437
391	1 e	304	Y+390	439	1 e	256	Y+438
392	1 e	303	Y+391	440	1 e	255	Y+439
393	1 e	302	Y+392	441	1 e	254	Y+440
394	1 e	301	Y+393	442	1 e	253	Y+441
395	1 e	300	Y+394	443	1 e	252	Y+442
396	1 e	299	Y+395	444	1 e	251	Y+443
397	1 e	298	Y+396	445	1 e	250	Y+444
398	1 e	297	Y+397	446	1 e	249	Y+445
399	1 e	296	Y+398	447	1 e	248	Y+446
400	1 e	295	Y+399	448	1 e	247	Y+447
401	1 e	294	Y+400	449	1 e	246	Y+448
402	1 e	293	Y+401	450	1 e	245	Y+449
403	1 e	292	Y+402	451	1 e	244	Y+450
404	1 e	291	Y+403	452	1 e	243	Y+451
405	1 e	290	Y+404	453	1 e	242	Y+452
406	1 e	289	Y+405	454	1 e	241	Y+453
407	1 e	288	Y+406	455	1 e	240	Y+454
408	1 e	287	Y+407	456	1 e	239	Y+455
409	1 e	286	Y+408	457	1 e	238	Y+456
410	1 e	285	Y+409	458	1 e	237	Y+457
411	1 e	284	Y+410	459	1 e	236	Y+458

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
412	1 e	283	Y+411	460	1 e	235	Y+459
413	1 e	282	Y+412	461	1 e	234	Y+460
414	1 e	281	Y+413	462	1 e	233	Y+461
415	1 e	280	Y+414	463	1 e	232	Y+462
416	1 e	279	Y+415	464	1 e	231	Y+463
417	1 e	278	Y+416	465	1 e	230	Y+464
418	1 e	277	Y+417	466	1 e	229	Y+465
419	1 e	276	Y+418	467	1 e	228	Y+466
420	1 e	275	Y+419	468	1 e	227	Y+467
421	1 e	274	Y+420	469	1 e	226	Y+468
422	1 e	273	Y+421	470	1 e	225	Y+469
423	1 e	272	Y+422	471	1 e	224	Y+470
424	1 e	271	Y+423	472	1 e	223	Y+471
425	1 e	270	Y+424	473	1 e	222	Y+472
426	1 e	269	Y+425	474	1 e	221	Y+473
427	1 e	268	Y+426	475	1 e	220	Y+474
428	1 e	267	Y+427	476	1 e	219	Y+475
429	1 e	266	Y+428	477	1 e	218	Y+476
430	1 e	265	Y+429	478	1 e	217	Y+477
431	1 e	264	Y+430	479	1 e	216	Y+478
432	1 e	263	Y+431	480	1 e	215	Y+479
433	1 e	262	Y+432	481	1 e	214	Y+480
434	1 e	261	Y+433	482	1 e	213	Y+481
435	1 e	260	Y+434	483	1 e	212	Y+482
436	1 e	259	Y+435	484	1 e	211	Y+483
485	1 e	210	Y+484	533	1 e	162	Y+532
486	1 e	209	Y+485	534	1 e	161	Y+533
487	1 e	208	Y+486	535	1 e	160	Y+534
488	1 e	207	Y+487	536	1 e	159	Y+535
489	1 e	206	Y+488	537	1 e	158	Y+536
490	1 e	205	Y+489	538	1 e	157	Y+537
491	1 e	204	Y+490	539	1 e	156	Y+538
492	1 e	203	Y+491	540	1 e	155	Y+539
493	1 e	202	Y+492	541	1 e	154	Y+540
494	1 e	201	Y+493	542	1 e	153	Y+541
495	1 e	200	Y+494	543	1 e	152	Y+542

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
496	1 e	199	Y+495	544	1 e	151	Y+543
497	1 e	198	Y+496	545	1 e	150	Y+544
498	1 e	197	Y+497	546	1 e	149	Y+545
499	1 e	196	Y+498	547	1 e	148	Y+546
500	1 e	195	Y+499	548	1 e	147	Y+547
501	1 e	194	Y+500	549	1 e	146	Y+548
502	1 e	193	Y+501	550	1 e	145	Y+549
503	1 e	192	Y+502	551	1 e	144	Y+550
504	1 e	191	Y+503	552	1 e	143	Y+551
505	1 e	190	Y+504	553	1 e	142	Y+552
506	1 e	189	Y+505	554	1 e	141	Y+553
507	1 e	188	Y+506	555	1 e	140	Y+554
508	1 e	187	Y+507	556	1 e	139	Y+555
509	1 e	186	Y+508	557	1 e	138	Y+556
510	1 e	185	Y+509	558	1 e	137	Y+557
511	1 e	184	Y+510	559	1 e	136	Y+558
512	1 e	183	Y+511	560	1 e	135	Y+559
513	1 e	182	Y+512	561	1 e	134	Y+560
514	1 e	181	Y+513	562	1 e	133	Y+561
515	1 e	180	Y+514	563	1 e	132	Y+562
516	1 e	179	Y+515	564	1 e	131	Y+563
517	1 e	178	Y+516	565	1 e	130	Y+564
518	1 e	177	Y+517	566	1 e	129	Y+565
519	1 e	176	Y+518	567	1 e	128	Y+566
520	1 e	175	Y+519	568	1 e	127	Y+567
521	1 e	174	Y+520	569	1 e	126	Y+568
522	1 e	173	Y+521	570	1 e	125	Y+569
523	1 e	172	Y+522	571	1 e	124	Y+570
524	1 e	171	Y+523	572	1 e	123	Y+571
525	1 e	170	Y+524	573	1 e	122	Y+572
526	1 e	169	Y+525	574	1 e	121	Y+573
527	1 e	168	Y+526	575	1 e	120	Y+574
528	1 e	167	Y+527	576	1 e	119	Y+575
529	1 e	166	Y+528	577	1 e	118	Y+576
530	1 e	165	Y+529	578	1 e	117	Y+577
531	1 e	164	Y+530	579	1 e	116	Y+578

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
532	1 e	163	Y+531	580	1 e	115	Y+579
581	1 e	114	Y+580	629	1 e	66	Y+628
582	1 e	113	Y+581	630	1 e	65	Y+629
583	1 e	112	Y+582	631	1 e	64	Y+630
584	1 e	111	Y+583	632	1 e	63	Y+631
585	1 e	110	Y+584	633	1 e	62	Y+632
586	1 e	109	Y+585	634	1 e	61	Y+633
587	1 e	108	Y+586	635	1 e	60	Y+634
588	1 e	107	Y+587	636	1 e	59	Y+635
589	1 e	106	Y+588	637	1 e	58	Y+636
590	1 e	105	Y+589	638	1 e	57	Y+637
591	1 e	104	Y+590	639	1 e	56	Y+638
592	1 e	103	Y+591	640	1 e	55	Y+639
593	1 e	102	Y+592	641	1 e	54	Y+640
594	1 e	101	Y+593	642	1 e	53	Y+641
595	1 e	100	Y+594	643	1 e	52	Y+642
596	1 e	99	Y+595	644	1 e	51	Y+643
597	1 e	98	Y+596	645	1 e	50	Y+644
598	1 e	97	Y+597	646	1 e	49	Y+645
599	1 e	96	Y+598	647	1 e	48	Y+646
600	1 e	95	Y+599	648	1 e	47	Y+647
601	1 e	94	Y+600	649	1 e	46	Y+648
602	1 e	93	Y+601	650	1 e	45	Y+649
603	1 e	92	Y+602	651	1 e	44	Y+650
604	1 e	91	Y+603	652	1 e	43	Y+651
605	1 e	90	Y+604	653	1 e	42	Y+652
606	1 e	89	Y+605	654	1 e	41	Y+653
607	1 e	88	Y+606	655	1 e	40	Y+654
608	1 e	87	Y+607	656	1 e	39	Y+655
609	1 e	86	Y+608	657	1 e	38	Y+656
610	1 e	85	Y+609	658	1 e	37	Y+657
611	1 e	84	Y+610	659	1 e	36	Y+658
612	1 e	83	Y+611	660	1 e	35	Y+659
613	1 e	82	Y+612	661	1 e	34	Y+660
614	1 e	81	Y+613	662	1 e	33	Y+661
615	1 e	80	Y+614	663	1 e	32	Y+662

Tabela 10. Fragmentos de SEQ ID NOs: 9 e 11.								
Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z		Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
616	1 e	79	Y+615		664	1 e	31	Y+663
617	1 e	78	Y+616		665	1 e	30	Y+664
618	1 e	77	Y+617		666	1 e	29	Y+665
619	1 e	76	Y+618		667	1 e	28	Y+666
620	1 e	75	Y+619		668	1 e	27	Y+667
621	1 e	74	Y+620		669	1 e	26	Y+668
622	1 e	73	Y+621		670	1 e	25	Y+669
623	1 e	72	Y+622		671	1 e	24	Y+670
624	1 e	71	Y+623		672	1 e	23	Y+671
625	1 e	70	Y+624		673	1 e	22	Y+672
626	1 e	69	Y+625		674	1 e	21	Y+673
627	1 e	68	Y+626		675	1 e	20	Y+674
628	1 e	67	Y+627		676	1 e	19	Y+675
677	1 e	18	Y+676					
678	1 e	17	Y+677					
679	1 e	16	Y+678					
680	1 e	15	Y+679					
681	1 e	14	Y+680					
682	1 e	13	Y+681					
683	1 e	12	Y+682					
684	1 e	11	Y+683					
685	1 e	10	Y+684					
686	1 e	9	Y+685					
687	1 e	8	Y+686					
688	1 e	7	Y+687					
689	1 e	6	Y+688					
690	1 e	5	Y+689					
691	1 e	4	Y+690					
692	1 e	3	Y+691					
693	1 e	2	Y+692					

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
5	1 e 598	Y+4	53	1 e 550	Y+52
6	1 e 597	Y+5	54	1 e 549	Y+53
7	1 e 596	Y+6	55	1 e 548	Y+54
8	1 e 595	Y+7	56	1 e 547	Y+55
9	1 e 594	Y+8	57	1 e 546	Y+56
10	1 e 593	Y+9	58	1 e 545	Y+57
11	1 e 592	Y+10	59	1 e 544	Y+58
12	1 e 591	Y+11	60	1 e 543	Y+59
13	1 e 590	Y+12	61	1 e 542	Y+60
14	1 e 589	Y+13	62	1 e 541	Y+61
15	1 e 588	Y+14	63	1 e 540	Y+62
16	1 e 587	Y+15	64	1 e 539	Y+63
17	1 e 586	Y+16	65	1 e 538	Y+64
18	1 e 585	Y+17	66	1 e 537	Y+65
19	1 e 584	Y+18	67	1 e 536	Y+66
20	1 e 583	Y+19	68	1 e 535	Y+67
21	1 e 582	Y+20	69	1 e 534	Y+68
22	1 e 581	Y+21	70	1 e 533	Y+69
23	1 e 580	Y+22	71	1 e 532	Y+70
24	1 e 579	Y+23	72	1 e 531	Y+71
25	1 e 578	Y+24	73	1 e 530	Y+72
26	1 e 577	Y+25	74	1 e 529	Y+73
27	1 e 576	Y+26	75	1 e 528	Y+74
28	1 e 575	Y+27	76	1 e 527	Y+75
29	1 e 574	Y+28	77	1 e 526	Y+76
30	1 e 573	Y+29	78	1 e 525	Y+77
31	1 e 572	Y+30	79	1 e 524	Y+78
32	1 e 571	Y+31	80	1 e 523	Y+79
33	1 e 570	Y+32	81	1 e 522	Y+80
34	1 e 569	Y+33	82	1 e 521	Y+81
35	1 e 568	Y+34	83	1 e 520	Y+82
36	1 e 567	Y+35	84	1 e 519	Y+83
37	1 e 566	Y+36	85	1 e 518	Y+84
38	1 e 565	Y+37	86	1 e 517	Y+85
39	1 e 564	Y+38	87	1 e 516	Y+86

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
40	1 e	563	Y+39
41	1 e	562	Y+40
42	1 e	561	Y+41
43	1 e	560	Y+42
44	1 e	559	Y+43
45	1 e	558	Y+44
46	1 e	557	Y+45
47	1 e	556	Y+46
48	1 e	555	Y+47
49	1 e	554	Y+48
50	1 e	553	Y+49
51	1 e	552	Y+50
52	1 e	551	Y+51
101	1 e	502	Y+100
102	1 e	501	Y+101
103	1 e	500	Y+102
104	1 e	499	Y+103
105	1 e	498	Y+104
106	1 e	497	Y+105
107	1 e	496	Y+106
108	1 e	495	Y+107
109	1 e	494	Y+108
110	1 e	493	Y+109
111	1 e	492	Y+110
112	1 e	491	Y+111
113	1 e	490	Y+112
114	1 e	489	Y+113
115	1 e	488	Y+114
116	1 e	487	Y+115
117	1 e	486	Y+116
118	1 e	485	Y+117
119	1 e	484	Y+118
120	1 e	483	Y+119
121	1 e	482	Y+120
122	1 e	481	Y+121

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
88	1 e	515	Y+87
89	1 e	514	Y+88
90	1 e	513	Y+89
91	1 e	512	Y+90
92	1 e	511	Y+91
93	1 e	510	Y+92
94	1 e	509	Y+93
95	1 e	508	Y+94
96	1 e	507	Y+95
97	1 e	506	Y+96
98	1 e	505	Y+97
99	1 e	504	Y+98
100	1 e	503	Y+99
149	1 e	454	Y+148
150	1 e	453	Y+149
151	1 e	452	Y+150
152	1 e	451	Y+151
153	1 e	450	Y+152
154	1 e	449	Y+153
155	1 e	448	Y+154
156	1 e	447	Y+155
157	1 e	446	Y+156
158	1 e	445	Y+157
159	1 e	444	Y+158
160	1 e	443	Y+159
161	1 e	442	Y+160
162	1 e	441	Y+161
163	1 e	440	Y+162
164	1 e	439	Y+163
165	1 e	438	Y+164
166	1 e	437	Y+165
167	1 e	436	Y+166
168	1 e	435	Y+167
169	1 e	434	Y+168
170	1 e	433	Y+169

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
123	1 e 480	Y+122	171	1 e 432	Y+170
124	1 e 479	Y+123	172	1 e 431	Y+171
125	1 e 478	Y+124	173	1 e 430	Y+172
126	1 e 477	Y+125	174	1 e 429	Y+173
127	1 e 476	Y+126	175	1 e 428	Y+174
128	1 e 475	Y+127	176	1 e 427	Y+175
129	1 e 474	Y+128	177	1 e 426	Y+176
130	1 e 473	Y+129	178	1 e 425	Y+177
131	1 e 472	Y+130	179	1 e 424	Y+178
132	1 e 471	Y+131	180	1 e 423	Y+179
133	1 e 470	Y+132	181	1 e 422	Y+180
134	1 e 469	Y+133	182	1 e 421	Y+181
135	1 e 468	Y+134	183	1 e 420	Y+182
136	1 e 467	Y+135	184	1 e 419	Y+183
137	1 e 466	Y+136	185	1 e 418	Y+184
138	1 e 465	Y+137	186	1 e 417	Y+185
139	1 e 464	Y+138	187	1 e 416	Y+186
140	1 e 463	Y+139	188	1 e 415	Y+187
141	1 e 462	Y+140	189	1 e 414	Y+188
142	1 e 461	Y+141	190	1 e 413	Y+189
143	1 e 460	Y+142	191	1 e 412	Y+190
144	1 e 459	Y+143	192	1 e 411	Y+191
145	1 e 458	Y+144	193	1 e 410	Y+192
146	1 e 457	Y+145	194	1 e 409	Y+193
147	1 e 456	Y+146	195	1 e 408	Y+194
148	1 e 455	Y+147	196	1 e 407	Y+195
197	1 e 406	Y+196	245	1 e 358	Y+244
198	1 e 405	Y+197	246	1 e 357	Y+245
199	1 e 404	Y+198	247	1 e 356	Y+246
200	1 e 403	Y+199	248	1 e 355	Y+247
201	1 e 402	Y+200	249	1 e 354	Y+248
202	1 e 401	Y+201	250	1 e 353	Y+249
203	1 e 400	Y+202	251	1 e 352	Y+250
204	1 e 399	Y+203	252	1 e 351	Y+251
205	1 e 398	Y+204	253	1 e 350	Y+252

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
206	1 e 397	Y+205	254	1 e 349	Y+253
207	1 e 396	Y+206	255	1 e 348	Y+254
208	1 e 395	Y+207	256	1 e 347	Y+255
209	1 e 394	Y+208	257	1 e 346	Y+256
210	1 e 393	Y+209	258	1 e 345	Y+257
211	1 e 392	Y+210	259	1 e 344	Y+258
212	1 e 391	Y+211	260	1 e 343	Y+259
213	1 e 390	Y+212	261	1 e 342	Y+260
214	1 e 389	Y+213	262	1 e 341	Y+261
215	1 e 388	Y+214	263	1 e 340	Y+262
216	1 e 387	Y+215	264	1 e 339	Y+263
217	1 e 386	Y+216	265	1 e 338	Y+264
218	1 e 385	Y+217	266	1 e 337	Y+265
219	1 e 384	Y+218	267	1 e 336	Y+266
220	1 e 383	Y+219	268	1 e 335	Y+267
221	1 e 382	Y+220	269	1 e 334	Y+268
222	1 e 381	Y+221	270	1 e 333	Y+269
223	1 e 380	Y+222	271	1 e 332	Y+270
224	1 e 379	Y+223	272	1 e 331	Y+271
225	1 e 378	Y+224	273	1 e 330	Y+272
226	1 e 377	Y+225	274	1 e 329	Y+273
227	1 e 376	Y+226	275	1 e 328	Y+274
228	1 e 375	Y+227	276	1 e 327	Y+275
229	1 e 374	Y+228	277	1 e 326	Y+276
230	1 e 373	Y+229	278	1 e 325	Y+277
231	1 e 372	Y+230	279	1 e 324	Y+278
232	1 e 371	Y+231	280	1 e 323	Y+279
233	1 e 370	Y+232	281	1 e 322	Y+280
234	1 e 369	Y+233	282	1 e 321	Y+281
235	1 e 368	Y+234	283	1 e 320	Y+282
236	1 e 367	Y+235	284	1 e 319	Y+283
237	1 e 366	Y+236	285	1 e 318	Y+284
238	1 e 365	Y+237	286	1 e 317	Y+285
239	1 e 364	Y+238	287	1 e 316	Y+286
240	1 e 363	Y+239	288	1 e 315	Y+287

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
241	1 e	362	Y+240
242	1 e	361	Y+241
243	1 e	360	Y+242
244	1 e	359	Y+243
293	1 e	310	Y+292
294	1 e	309	Y+293
295	1 e	308	Y+294
296	1 e	307	Y+295
297	1 e	306	Y+296
298	1 e	305	Y+297
299	1 e	304	Y+298
300	1 e	303	Y+299
301	1 e	302	Y+300
302	1 e	301	Y+301
303	1 e	300	Y+302
304	1 e	299	Y+303
305	1 e	298	Y+304
306	1 e	297	Y+305
307	1 e	296	Y+306
308	1 e	295	Y+307
309	1 e	294	Y+308
310	1 e	293	Y+309
311	1 e	292	Y+310
312	1 e	291	Y+311
313	1 e	290	Y+312
314	1 e	289	Y+313
315	1 e	288	Y+314
316	1 e	287	Y+315
317	1 e	286	Y+316
318	1 e	285	Y+317
319	1 e	284	Y+318
320	1 e	283	Y+319
321	1 e	282	Y+320
322	1 e	281	Y+321
323	1 e	280	Y+322

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
289	1 e	314	Y+288
290	1 e	313	Y+289
291	1 e	312	Y+290
292	1 e	311	Y+291
341	1 e	262	Y+340
342	1 e	261	Y+341
343	1 e	260	Y+342
344	1 e	259	Y+343
345	1 e	258	Y+344
346	1 e	257	Y+345
347	1 e	256	Y+346
348	1 e	255	Y+347
349	1 e	254	Y+348
350	1 e	253	Y+349
351	1 e	252	Y+350
352	1 e	251	Y+351
353	1 e	250	Y+352
354	1 e	249	Y+353
355	1 e	248	Y+354
356	1 e	247	Y+355
357	1 e	246	Y+356
358	1 e	245	Y+357
359	1 e	244	Y+358
360	1 e	243	Y+359
361	1 e	242	Y+360
362	1 e	241	Y+361
363	1 e	240	Y+362
364	1 e	239	Y+363
365	1 e	238	Y+364
366	1 e	237	Y+365
367	1 e	236	Y+366
368	1 e	235	Y+367
369	1 e	234	Y+368
370	1 e	233	Y+369
371	1 e	232	Y+370

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
324	1 e 279	Y+323	372	1 e 231	Y+371
325	1 e 278	Y+324	373	1 e 230	Y+372
326	1 e 277	Y+325	374	1 e 229	Y+373
327	1 e 276	Y+326	375	1 e 228	Y+374
328	1 e 275	Y+327	376	1 e 227	Y+375
329	1 e 274	Y+328	377	1 e 226	Y+376
330	1 e 273	Y+329	378	1 e 225	Y+377
331	1 e 272	Y+330	379	1 e 224	Y+378
332	1 e 271	Y+331	380	1 e 223	Y+379
333	1 e 270	Y+332	381	1 e 222	Y+380
334	1 e 269	Y+333	382	1 e 221	Y+381
335	1 e 268	Y+334	383	1 e 220	Y+382
336	1 e 267	Y+335	384	1 e 219	Y+383
337	1 e 266	Y+336	385	1 e 218	Y+384
338	1 e 265	Y+337	386	1 e 217	Y+385
339	1 e 264	Y+338	387	1 e 216	Y+386
340	1 e 263	Y+339	388	1 e 215	Y+387
389	1 e 214	Y+388	437	1 e 166	Y+436
390	1 e 213	Y+389	438	1 e 165	Y+437
391	1 e 212	Y+390	439	1 e 164	Y+438
392	1 e 211	Y+391	440	1 e 163	Y+439
393	1 e 210	Y+392	441	1 e 162	Y+440
394	1 e 209	Y+393	442	1 e 161	Y+441
395	1 e 208	Y+394	443	1 e 160	Y+442
396	1 e 207	Y+395	444	1 e 159	Y+443
397	1 e 206	Y+396	445	1 e 158	Y+444
398	1 e 205	Y+397	446	1 e 157	Y+445
399	1 e 204	Y+398	447	1 e 156	Y+446
400	1 e 203	Y+399	448	1 e 155	Y+447
401	1 e 202	Y+400	449	1 e 154	Y+448
402	1 e 201	Y+401	450	1 e 153	Y+449
403	1 e 200	Y+402	451	1 e 152	Y+450
404	1 e 199	Y+403	452	1 e 151	Y+451
405	1 e 198	Y+404	453	1 e 150	Y+452
406	1 e 197	Y+405	454	1 e 149	Y+453

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
407	1 e 196	Y+406	455	1 e 148	Y+454
408	1 e 195	Y+407	456	1 e 147	Y+455
409	1 e 194	Y+408	457	1 e 146	Y+456
410	1 e 193	Y+409	458	1 e 145	Y+457
411	1 e 192	Y+410	459	1 e 144	Y+458
412	1 e 191	Y+411	460	1 e 143	Y+459
413	1 e 190	Y+412	461	1 e 142	Y+460
414	1 e 189	Y+413	462	1 e 141	Y+461
415	1 e 188	Y+414	463	1 e 140	Y+462
416	1 e 187	Y+415	464	1 e 139	Y+463
417	1 e 186	Y+416	465	1 e 138	Y+464
418	1 e 185	Y+417	466	1 e 137	Y+465
419	1 e 184	Y+418	467	1 e 136	Y+466
420	1 e 183	Y+419	468	1 e 135	Y+467
421	1 e 182	Y+420	469	1 e 134	Y+468
422	1 e 181	Y+421	470	1 e 133	Y+469
423	1 e 180	Y+422	471	1 e 132	Y+470
424	1 e 179	Y+423	472	1 e 131	Y+471
425	1 e 178	Y+424	473	1 e 130	Y+472
426	1 e 177	Y+425	474	1 e 129	Y+473
427	1 e 176	Y+426	475	1 e 128	Y+474
428	1 e 175	Y+427	476	1 e 127	Y+475
429	1 e 174	Y+428	477	1 e 126	Y+476
430	1 e 173	Y+429	478	1 e 125	Y+477
431	1 e 172	Y+430	479	1 e 124	Y+478
432	1 e 171	Y+431	480	1 e 123	Y+479
433	1 e 170	Y+432	481	1 e 122	Y+480
434	1 e 169	Y+433	482	1 e 121	Y+481
435	1 e 168	Y+434	483	1 e 120	Y+482
436	1 e 167	Y+435	484	1 e 119	Y+483
485	1 e 118	Y+484	533	1 e 70	Y+532
486	1 e 117	Y+485	534	1 e 69	Y+533
487	1 e 116	Y+486	535	1 e 68	Y+534
488	1 e 115	Y+487	536	1 e 67	Y+535
489	1 e 114	Y+488	537	1 e 66	Y+536

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
490	1 e 113	Y+489	538	1 e 65	Y+537
491	1 e 112	Y+490	539	1 e 64	Y+538
492	1 e 111	Y+491	540	1 e 63	Y+539
493	1 e 110	Y+492	541	1 e 62	Y+540
494	1 e 109	Y+493	542	1 e 61	Y+541
495	1 e 108	Y+494	543	1 e 60	Y+542
496	1 e 107	Y+495	544	1 e 59	Y+543
497	1 e 106	Y+496	545	1 e 58	Y+544
498	1 e 105	Y+497	546	1 e 57	Y+545
499	1 e 104	Y+498	547	1 e 56	Y+546
500	1 e 103	Y+499	548	1 e 55	Y+547
501	1 e 102	Y+500	549	1 e 54	Y+548
502	1 e 101	Y+501	550	1 e 53	Y+549
503	1 e 100	Y+502	551	1 e 52	Y+550
504	1 e 99	Y+503	552	1 e 51	Y+551
505	1 e 98	Y+504	553	1 e 50	Y+552
506	1 e 97	Y+505	554	1 e 49	Y+553
507	1 e 96	Y+506	555	1 e 48	Y+554
508	1 e 95	Y+507	556	1 e 47	Y+555
509	1 e 94	Y+508	557	1 e 46	Y+556
510	1 e 93	Y+509	558	1 e 45	Y+557
511	1 e 92	Y+510	559	1 e 44	Y+558
512	1 e 91	Y+511	560	1 e 43	Y+559
513	1 e 90	Y+512	561	1 e 42	Y+560
514	1 e 89	Y+513	562	1 e 41	Y+561
515	1 e 88	Y+514	563	1 e 40	Y+562
516	1 e 87	Y+515	564	1 e 39	Y+563
517	1 e 86	Y+516	565	1 e 38	Y+564
518	1 e 85	Y+517	566	1 e 37	Y+565
519	1 e 84	Y+518	567	1 e 36	Y+566
520	1 e 83	Y+519	568	1 e 35	Y+567
521	1 e 82	Y+520	569	1 e 34	Y+568
522	1 e 81	Y+521	570	1 e 33	Y+569
523	1 e 80	Y+522	571	1 e 32	Y+570
524	1 e 79	Y+523	572	1 e 31	Y+571

Tabela 11. Fragmentos de SEQ ID NO: 13.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
525	1 e 78	Y+524	573	1 e 30	Y+572
526	1 e 77	Y+525	574	1 e 29	Y+573
527	1 e 76	Y+526	575	1 e 28	Y+574
528	1 e 75	Y+527	576	1 e 27	Y+575
529	1 e 74	Y+528	577	1 e 26	Y+576
530	1 e 73	Y+529	578	1 e 25	Y+577
531	1 e 72	Y+530	579	1 e 24	Y+578
532	1 e 71	Y+531	580	1 e 23	Y+579
581	1 e 22	Y+580			
582	1 e 21	Y+581			
583	1 e 20	Y+582			
584	1 e 19	Y+583			
585	1 e 18	Y+584			
586	1 e 17	Y+585			
587	1 e 16	Y+586			
588	1 e 15	Y+587			
589	1 e 14	Y+588			
590	1 e 13	Y+589			
591	1 e 12	Y+590			
592	1 e 11	Y+591			
593	1 e 10	Y+592			
594	1 e 9	Y+593			
595	1 e 8	Y+594			
596	1 e 7	Y+595			
597	1 e 6	Y+596			
598	1 e 5	Y+597			
599	1 e 4	Y+598			
600	1 e 3	Y+599			
601	1 e 2	Y+600			

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
5	1 e 597	Y+4	53	1 e 549	Y+52
6	1 e 596	Y+5	54	1 e 548	Y+53
7	1 e 595	Y+6	55	1 e 547	Y+54
8	1 e 594	Y+7	56	1 e 546	Y+55
9	1 e 593	Y+8	57	1 e 545	Y+56
10	1 e 592	Y+9	58	1 e 544	Y+57
11	1 e 591	Y+10	59	1 e 543	Y+58
12	1 e 590	Y+11	60	1 e 542	Y+59
13	1 e 589	Y+12	61	1 e 541	Y+60
14	1 e 588	Y+13	62	1 e 540	Y+61
15	1 e 587	Y+14	63	1 e 539	Y+62
16	1 e 586	Y+15	64	1 e 538	Y+63
17	1 e 585	Y+16	65	1 e 537	Y+64
18	1 e 584	Y+17	66	1 e 536	Y+65
19	1 e 583	Y+18	67	1 e 535	Y+66
20	1 e 582	Y+19	68	1 e 534	Y+67
21	1 e 581	Y+20	69	1 e 533	Y+68
22	1 e 580	Y+21	70	1 e 532	Y+69
23	1 e 579	Y+22	71	1 e 531	Y+70
24	1 e 578	Y+23	72	1 e 530	Y+71
25	1 e 577	Y+24	73	1 e 529	Y+72
26	1 e 576	Y+25	74	1 e 528	Y+73
27	1 e 575	Y+26	75	1 e 527	Y+74
28	1 e 574	Y+27	76	1 e 526	Y+75
29	1 e 573	Y+28	77	1 e 525	Y+76
30	1 e 572	Y+29	78	1 e 524	Y+77
31	1 e 571	Y+30	79	1 e 523	Y+78
32	1 e 570	Y+31	80	1 e 522	Y+79
33	1 e 569	Y+32	81	1 e 521	Y+80
34	1 e 568	Y+33	82	1 e 520	Y+81
35	1 e 567	Y+34	83	1 e 519	Y+82
36	1 e 566	Y+35	84	1 e 518	Y+83
37	1 e 565	Y+36	85	1 e 517	Y+84
38	1 e 564	Y+37	86	1 e 516	Y+85
39	1 e 563	Y+38	87	1 e 515	Y+86

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
40	1 e 562	Y+39	88	1 e 514	Y+87
41	1 e 561	Y+40	89	1 e 513	Y+88
42	1 e 560	Y+41	90	1 e 512	Y+89
43	1 e 559	Y+42	91	1 e 511	Y+90
44	1 e 558	Y+43	92	1 e 510	Y+91
45	1 e 557	Y+44	93	1 e 509	Y+92
46	1 e 556	Y+45	94	1 e 508	Y+93
47	1 e 555	Y+46	95	1 e 507	Y+94
48	1 e 554	Y+47	96	1 e 506	Y+95
49	1 e 553	Y+48	97	1 e 505	Y+96
50	1 e 552	Y+49	98	1 e 504	Y+97
51	1 e 551	Y+50	99	1 e 503	Y+98
52	1 e 550	Y+51	100	1 e 502	Y+99
101	1 e 501	Y+100	149	1 e 453	Y+148
102	1 e 500	Y+101	150	1 e 452	Y+149
103	1 e 499	Y+102	151	1 e 451	Y+150
104	1 e 498	Y+103	152	1 e 450	Y+151
105	1 e 497	Y+104	153	1 e 449	Y+152
106	1 e 496	Y+105	154	1 e 448	Y+153
107	1 e 495	Y+106	155	1 e 447	Y+154
108	1 e 494	Y+107	156	1 e 446	Y+155
109	1 e 493	Y+108	157	1 e 445	Y+156
110	1 e 492	Y+109	158	1 e 444	Y+157
111	1 e 491	Y+110	159	1 e 443	Y+158
112	1 e 490	Y+111	160	1 e 442	Y+159
113	1 e 489	Y+112	161	1 e 441	Y+160
114	1 e 488	Y+113	162	1 e 440	Y+161
115	1 e 487	Y+114	163	1 e 439	Y+162
116	1 e 486	Y+115	164	1 e 438	Y+163
117	1 e 485	Y+116	165	1 e 437	Y+164
118	1 e 484	Y+117	166	1 e 436	Y+165
119	1 e 483	Y+118	167	1 e 435	Y+166
120	1 e 482	Y+119	168	1 e 434	Y+167
121	1 e 481	Y+120	169	1 e 433	Y+168
122	1 e 480	Y+121	170	1 e 432	Y+169

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
123	1 e 479	Y+122	171	1 e 431	Y+170
124	1 e 478	Y+123	172	1 e 430	Y+171
125	1 e 477	Y+124	173	1 e 429	Y+172
126	1 e 476	Y+125	174	1 e 428	Y+173
127	1 e 475	Y+126	175	1 e 427	Y+174
128	1 e 474	Y+127	176	1 e 426	Y+175
129	1 e 473	Y+128	177	1 e 425	Y+176
130	1 e 472	Y+129	178	1 e 424	Y+177
131	1 e 471	Y+130	179	1 e 423	Y+178
132	1 e 470	Y+131	180	1 e 422	Y+179
133	1 e 469	Y+132	181	1 e 421	Y+180
134	1 e 468	Y+133	182	1 e 420	Y+181
135	1 e 467	Y+134	183	1 e 419	Y+182
136	1 e 466	Y+135	184	1 e 418	Y+183
137	1 e 465	Y+136	185	1 e 417	Y+184
138	1 e 464	Y+137	186	1 e 416	Y+185
139	1 e 463	Y+138	187	1 e 415	Y+186
140	1 e 462	Y+139	188	1 e 414	Y+187
141	1 e 461	Y+140	189	1 e 413	Y+188
142	1 e 460	Y+141	190	1 e 412	Y+189
143	1 e 459	Y+142	191	1 e 411	Y+190
144	1 e 458	Y+143	192	1 e 410	Y+191
145	1 e 457	Y+144	193	1 e 409	Y+192
146	1 e 456	Y+145	194	1 e 408	Y+193
147	1 e 455	Y+146	195	1 e 407	Y+194
148	1 e 454	Y+147	196	1 e 406	Y+195
197	1 e 405	Y+196	245	1 e 357	Y+244
198	1 e 404	Y+197	246	1 e 356	Y+245
199	1 e 403	Y+198	247	1 e 355	Y+246
200	1 e 402	Y+199	248	1 e 354	Y+247
201	1 e 401	Y+200	249	1 e 353	Y+248
202	1 e 400	Y+201	250	1 e 352	Y+249
203	1 e 399	Y+202	251	1 e 351	Y+250
204	1 e 398	Y+203	252	1 e 350	Y+251
205	1 e 397	Y+204	253	1 e 349	Y+252

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
206	1 e 396	Y+205	254	1 e 348	Y+253
207	1 e 395	Y+206	255	1 e 347	Y+254
208	1 e 394	Y+207	256	1 e 346	Y+255
209	1 e 393	Y+208	257	1 e 345	Y+256
210	1 e 392	Y+209	258	1 e 344	Y+257
211	1 e 391	Y+210	259	1 e 343	Y+258
212	1 e 390	Y+211	260	1 e 342	Y+259
213	1 e 389	Y+212	261	1 e 341	Y+260
214	1 e 388	Y+213	262	1 e 340	Y+261
215	1 e 387	Y+214	263	1 e 339	Y+262
216	1 e 386	Y+215	264	1 e 338	Y+263
217	1 e 385	Y+216	265	1 e 337	Y+264
218	1 e 384	Y+217	266	1 e 336	Y+265
219	1 e 383	Y+218	267	1 e 335	Y+266
220	1 e 382	Y+219	268	1 e 334	Y+267
221	1 e 381	Y+220	269	1 e 333	Y+268
222	1 e 380	Y+221	270	1 e 332	Y+269
223	1 e 379	Y+222	271	1 e 331	Y+270
224	1 e 378	Y+223	272	1 e 330	Y+271
225	1 e 377	Y+224	273	1 e 329	Y+272
226	1 e 376	Y+225	274	1 e 328	Y+273
227	1 e 375	Y+226	275	1 e 327	Y+274
228	1 e 374	Y+227	276	1 e 326	Y+275
229	1 e 373	Y+228	277	1 e 325	Y+276
230	1 e 372	Y+229	278	1 e 324	Y+277
231	1 e 371	Y+230	279	1 e 323	Y+278
232	1 e 370	Y+231	280	1 e 322	Y+279
233	1 e 369	Y+232	281	1 e 321	Y+280
234	1 e 368	Y+233	282	1 e 320	Y+281
235	1 e 367	Y+234	283	1 e 319	Y+282
236	1 e 366	Y+235	284	1 e 318	Y+283
237	1 e 365	Y+236	285	1 e 317	Y+284
238	1 e 364	Y+237	286	1 e 316	Y+285
239	1 e 363	Y+238	287	1 e 315	Y+286
240	1 e 362	Y+239	288	1 e 314	Y+287

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
241	1 e 361	Y+240	289	1 e 313	Y+288
242	1 e 360	Y+241	290	1 e 312	Y+289
243	1 e 359	Y+242	291	1 e 311	Y+290
244	1 e 358	Y+243	292	1 e 310	Y+291
293	1 e 309	Y+292	341	1 e 261	Y+340
294	1 e 308	Y+293	342	1 e 260	Y+341
295	1 e 307	Y+294	343	1 e 259	Y+342
296	1 e 306	Y+295	344	1 e 258	Y+343
297	1 e 305	Y+296	345	1 e 257	Y+344
298	1 e 304	Y+297	346	1 e 256	Y+345
299	1 e 303	Y+298	347	1 e 255	Y+346
300	1 e 302	Y+299	348	1 e 254	Y+347
301	1 e 301	Y+300	349	1 e 253	Y+348
302	1 e 300	Y+301	350	1 e 252	Y+349
303	1 e 299	Y+302	351	1 e 251	Y+350
304	1 e 298	Y+303	352	1 e 250	Y+351
305	1 e 297	Y+304	353	1 e 249	Y+352
306	1 e 296	Y+305	354	1 e 248	Y+353
307	1 e 295	Y+306	355	1 e 247	Y+354
308	1 e 294	Y+307	356	1 e 246	Y+355
309	1 e 293	Y+308	357	1 e 245	Y+356
310	1 e 292	Y+309	358	1 e 244	Y+357
311	1 e 291	Y+310	359	1 e 243	Y+358
312	1 e 290	Y+311	360	1 e 242	Y+359
313	1 e 289	Y+312	361	1 e 241	Y+360
314	1 e 288	Y+313	362	1 e 240	Y+361
315	1 e 287	Y+314	363	1 e 239	Y+362
316	1 e 286	Y+315	364	1 e 238	Y+363
317	1 e 285	Y+316	365	1 e 237	Y+364
318	1 e 284	Y+317	366	1 e 236	Y+365
319	1 e 283	Y+318	367	1 e 235	Y+366
320	1 e 282	Y+319	368	1 e 234	Y+367
321	1 e 281	Y+320	369	1 e 233	Y+368
322	1 e 280	Y+321	370	1 e 232	Y+369
323	1 e 279	Y+322	371	1 e 231	Y+370

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (amino-ácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
324	1 e 278	Y+323	372	1 e 230	Y+371
325	1 e 277	Y+324	373	1 e 229	Y+372
326	1 e 276	Y+325	374	1 e 228	Y+373
327	1 e 275	Y+326	375	1 e 227	Y+374
328	1 e 274	Y+327	376	1 e 226	Y+375
329	1 e 273	Y+328	377	1 e 225	Y+376
330	1 e 272	Y+329	378	1 e 224	Y+377
331	1 e 271	Y+330	379	1 e 223	Y+378
332	1 e 270	Y+331	380	1 e 222	Y+379
333	1 e 269	Y+332	381	1 e 221	Y+380
334	1 e 268	Y+333	382	1 e 220	Y+381
335	1 e 267	Y+334	383	1 e 219	Y+382
336	1 e 266	Y+335	384	1 e 218	Y+383
337	1 e 265	Y+336	385	1 e 217	Y+384
338	1 e 264	Y+337	386	1 e 216	Y+385
339	1 e 263	Y+338	387	1 e 215	Y+386
340	1 e 262	Y+339	388	1 e 214	Y+387
389	1 e 213	Y+388	437	1 e 165	Y+436
390	1 e 212	Y+389	438	1 e 164	Y+437
391	1 e 211	Y+390	439	1 e 163	Y+438
392	1 e 210	Y+391	440	1 e 162	Y+439
393	1 e 209	Y+392	441	1 e 161	Y+440
394	1 e 208	Y+393	442	1 e 160	Y+441
395	1 e 207	Y+394	443	1 e 159	Y+442
396	1 e 206	Y+395	444	1 e 158	Y+443
397	1 e 205	Y+396	445	1 e 157	Y+444
398	1 e 204	Y+397	446	1 e 156	Y+445
399	1 e 203	Y+398	447	1 e 155	Y+446
400	1 e 202	Y+399	448	1 e 154	Y+447
401	1 e 201	Y+400	449	1 e 153	Y+448
402	1 e 200	Y+401	450	1 e 152	Y+449
403	1 e 199	Y+402	451	1 e 151	Y+450
404	1 e 198	Y+403	452	1 e 150	Y+451
405	1 e 197	Y+404	453	1 e 149	Y+452
406	1 e 196	Y+405	454	1 e 148	Y+453

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
407	1 e	195	Y+406
408	1 e	194	Y+407
409	1 e	193	Y+408
410	1 e	192	Y+409
411	1 e	191	Y+410
412	1 e	190	Y+411
413	1 e	189	Y+412
414	1 e	188	Y+413
415	1 e	187	Y+414
416	1 e	186	Y+415
417	1 e	185	Y+416
418	1 e	184	Y+417
419	1 e	183	Y+418
420	1 e	182	Y+419
421	1 e	181	Y+420
422	1 e	180	Y+421
423	1 e	179	Y+422
424	1 e	178	Y+423
425	1 e	177	Y+424
426	1 e	176	Y+425
427	1 e	175	Y+426
428	1 e	174	Y+427
429	1 e	173	Y+428
430	1 e	172	Y+429
431	1 e	171	Y+430
432	1 e	170	Y+431
433	1 e	169	Y+432
434	1 e	168	Y+433
435	1 e	167	Y+434
436	1 e	166	Y+435
485	1 e	117	Y+484
486	1 e	116	Y+485
487	1 e	115	Y+486
488	1 e	114	Y+487
489	1 e	113	Y+488

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:		Z
455	1 e	147	Y+454
456	1 e	146	Y+455
457	1 e	145	Y+456
458	1 e	144	Y+457
459	1 e	143	Y+458
460	1 e	142	Y+459
461	1 e	141	Y+460
462	1 e	140	Y+461
463	1 e	139	Y+462
464	1 e	138	Y+463
465	1 e	137	Y+464
466	1 e	136	Y+465
467	1 e	135	Y+466
468	1 e	134	Y+467
469	1 e	133	Y+468
470	1 e	132	Y+469
471	1 e	131	Y+470
472	1 e	130	Y+471
473	1 e	129	Y+472
474	1 e	128	Y+473
475	1 e	127	Y+474
476	1 e	126	Y+475
477	1 e	125	Y+476
478	1 e	124	Y+477
479	1 e	123	Y+478
480	1 e	122	Y+479
481	1 e	121	Y+480
482	1 e	120	Y+481
483	1 e	119	Y+482
484	1 e	118	Y+483
533	1 e	69	Y+532
534	1 e	68	Y+533
535	1 e	67	Y+534
536	1 e	66	Y+535
537	1 e	65	Y+536

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
490	1 e 112	Y+489	538	1 e 64	Y+537
491	1 e 111	Y+490	539	1 e 63	Y+538
492	1 e 110	Y+491	540	1 e 62	Y+539
493	1 e 109	Y+492	541	1 e 61	Y+540
494	1 e 108	Y+493	542	1 e 60	Y+541
495	1 e 107	Y+494	543	1 e 59	Y+542
496	1 e 106	Y+495	544	1 e 58	Y+543
497	1 e 105	Y+496	545	1 e 57	Y+544
498	1 e 104	Y+497	546	1 e 56	Y+545
499	1 e 103	Y+498	547	1 e 55	Y+546
500	1 e 102	Y+499	548	1 e 54	Y+547
501	1 e 101	Y+500	549	1 e 53	Y+548
502	1 e 100	Y+501	550	1 e 52	Y+549
503	1 e 99	Y+502	551	1 e 51	Y+550
504	1 e 98	Y+503	552	1 e 50	Y+551
505	1 e 97	Y+504	553	1 e 49	Y+552
506	1 e 96	Y+505	554	1 e 48	Y+553
507	1 e 95	Y+506	555	1 e 47	Y+554
508	1 e 94	Y+507	556	1 e 46	Y+555
509	1 e 93	Y+508	557	1 e 45	Y+556
510	1 e 92	Y+509	558	1 e 44	Y+557
511	1 e 91	Y+510	559	1 e 43	Y+558
512	1 e 90	Y+511	560	1 e 42	Y+559
513	1 e 89	Y+512	561	1 e 41	Y+560
514	1 e 88	Y+513	562	1 e 40	Y+561
515	1 e 87	Y+514	563	1 e 39	Y+562
516	1 e 86	Y+515	564	1 e 38	Y+563
517	1 e 85	Y+516	565	1 e 37	Y+564
518	1 e 84	Y+517	566	1 e 36	Y+565
519	1 e 83	Y+518	567	1 e 35	Y+566
520	1 e 82	Y+519	568	1 e 34	Y+567
521	1 e 81	Y+520	569	1 e 33	Y+568
522	1 e 80	Y+521	570	1 e 32	Y+569
523	1 e 79	Y+522	571	1 e 31	Y+570
524	1 e 78	Y+523	572	1 e 30	Y+571

Tabela 12. Fragmentos de SEQ ID NO: 15.

Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z	Extensão do Fragmento (aminoácidos)	Y é qualquer número inteiro selecionado entre, e incluindo:	Z
525	1 e 77	Y+524	573	1 e 29	Y+572
526	1 e 76	Y+525	574	1 e 28	Y+573
527	1 e 75	Y+526	575	1 e 27	Y+574
528	1 e 74	Y+527	576	1 e 26	Y+575
529	1 e 73	Y+528	577	1 e 25	Y+576
530	1 e 72	Y+529	578	1 e 24	Y+577
531	1 e 71	Y+530	579	1 e 23	Y+578
532	1 e 70	Y+531	580	1 e 22	Y+579
581	1 e 21	Y+580			
582	1 e 20	Y+581			
583	1 e 19	Y+582			
584	1 e 18	Y+583			
585	1 e 17	Y+584			
586	1 e 16	Y+585			
587	1 e 15	Y+586			
588	1 e 14	Y+587			
589	1 e 13	Y+588			
590	1 e 12	Y+589			
591	1 e 11	Y+590			
592	1 e 10	Y+591			
593	1 e 9	Y+592			
594	1 e 8	Y+593			
595	1 e 7	Y+594			
596	1 e 6	Y+595			
597	1 e 5	Y+596			
598	1 e 4	Y+597			
599	1 e 3	Y+598			
600	1 e 2	Y+599			

Tabela 13, teor de G+C (%)

40,0	45,1
40,1	45,2
40,2	45,3
40,3	45,4
40,4	45,5
40,5	45,6
40,6	45,7
40,7	45,8
40,8	45,9
40,9	46,0
41,0	46,1
41,1	46,2
41,2	46,3
41,3	46,4
41,4	46,5
41,5	46,6
41,6	46,7
41,7	46,8
41,8	46,9
41,9	47,0
42,0	47,1
42,1	47,2
42,2	47,3
42,3	47,4
42,4	47,5
42,5	47,6
42,6	47,7
42,7	47,8
42,8	47,9
42,9	48,0
43,0	48,1
43,1	48,2
43,2	48,3
43,3	48,4

Tabela 13, teor de G+C (%)

43,4	48,5
43,5	48,6
43,6	48,7
43,7	48,8
43,8	48,9
43,9	49,0
44,0	49,1
44,1	49,2
44,2	49,3
44,3	49,4
44,4	49,5
44,5	49,6
44,6	49,7
44,7	49,8
44,8	49,9
44,9	50,0
45,0	

Tabela 14, Percentagem de Identidade

70,0	75,1	80,2	85,3	90,4	95,5
70,1	75,2	80,3	85,4	90,5	95,6
70,2	75,3	80,4	85,5	90,6	95,7
70,3	75,4	80,5	85,6	90,7	95,8
70,4	75,5	80,6	85,7	90,8	95,9
70,5	75,6	80,7	85,8	90,9	96,0
70,6	75,7	80,8	85,9	91,0	96,1
70,7	75,8	80,9	86,0	91,1	96,2
70,8	75,9	81,0	86,1	91,2	96,3
70,9	76,0	81,1	86,2	91,3	96,4
71,0	76,1	81,2	86,3	91,4	96,5
71,1	76,2	81,3	86,4	91,5	96,6
71,2	76,3	81,4	86,5	91,6	96,7
71,3	76,4	81,5	86,6	91,7	96,8
71,4	76,5	81,6	86,7	91,8	96,9
71,5	76,6	81,7	86,8	91,9	97,0
71,6	76,7	81,8	86,9	92,0	97,1
71,7	76,8	81,9	87,0	92,1	97,2
71,8	76,9	82,0	87,1	92,2	97,3
71,9	77,0	82,1	87,2	92,3	97,4
72,0	77,1	82,2	87,3	92,4	97,5
72,1	77,2	82,3	87,4	92,5	97,6
72,2	77,3	82,4	87,5	92,6	97,7
72,3	77,4	82,5	87,6	92,7	97,8
72,4	77,5	82,6	87,7	92,8	97,9
72,5	77,6	82,7	87,8	92,9	98,0
72,6	77,7	82,8	87,9	93,0	98,1
72,7	77,8	82,9	88,0	93,1	98,2
72,8	77,9	83,0	88,1	93,2	98,3
72,9	78,0	83,1	88,2	93,3	98,4
73,0	78,1	83,2	88,3	93,4	98,5
73,1	78,2	83,3	88,4	93,5	98,6
73,2	78,3	83,4	88,5	93,6	98,7
73,3	78,4	83,5	88,6	93,7	98,8

Tabela 14, Percentagem de Identidade

73,4	78,5	83,6	88,7	93,8	98,9
73,5	78,6	83,7	88,8	93,9	99,0
73,6	78,7	83,8	88,9	94,0	99,1
73,7	78,8	83,9	89,0	94,1	99,2
73,8	78,9	84,0	89,1	94,2	99,3
73,9	79,0	84,1	89,2	94,3	99,4
74,0	79,1	84,2	89,3	94,4	99,5
74,1	79,2	84,3	89,4	94,5	99,6
74,2	79,3	84,4	89,5	94,6	99,7
74,3	79,4	84,5	89,6	94,7	99,8
74,4	79,5	84,6	89,7	94,8	99,9
74,5	79,6	84,7	89,8	94,9	100,0
74,6	79,7	84,8	89,9	95,0	
74,7	79,8	84,9	90,0	95,1	
74,8	79,9	85,0	90,1	95,2	
74,9	80,0	85,1	90,2	95,3	
75,0	80,1	85,2	90,3	95,4	

Polipeptídeos ou Fragmentos Exemplares	Tabela 15. Fragmentos ou trechos de polipeptídeos exemplares contendo os seguintes aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 9.				
1	1-22				
2	1-22	343			
3	1-22	343	344		
4	1-22	343	344	345	
5	1-22	343	344	345	691-694
6		343			
7		343	344		
8		343	344	345	
9		343	344	345	691-694
10			344		
11			344	345	691-694
12				345	
13				345	691-694
14					691-694

Tabela 16. Vários Fragmentos Exemplares de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 e 15.

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
5	93	668	9 ou 11	1	690	9 ou 11	3	692
5	168	668	9 ou 11	2	690	9 ou 11	4	692
9 ou 11	1	114	9 ou 11	3	690	9 ou 11	5	692
9 ou 11	2	114	9 ou 11	4	690	9 ou 11	6	692
9 ou 11	3	114	9 ou 11	5	690	9 ou 11	7	692
9 ou 11	4	114	9 ou 11	6	690	9 ou 11	8	692
9 ou 11	5	114	9 ou 11	7	690	9 ou 11	9	692
9 ou 11	6	114	9 ou 11	8	690	9 ou 11	10	692
9 ou 11	7	114	9 ou 11	9	690	9 ou 11	11	692
9 ou 11	8	114	9 ou 11	10	690	9 ou 11	12	692
9 ou 11	9	114	9 ou 11	11	690	9 ou 11	13	692
9 ou 11	10	114	9 ou 11	12	690	9 ou 11	14	692
9 ou 11	11	114	9 ou 11	13	690	9 ou 11	15	692
9 ou 11	12	114	9 ou 11	14	690	9 ou 11	16	692
9 ou 11	13	114	9 ou 11	15	690	9 ou 11	17	692
9 ou 11	14	114	9 ou 11	16	690	9 ou 11	18	692
9 ou 11	15	114	9 ou 11	17	690	9 ou 11	19	692
9 ou 11	16	114	9 ou 11	18	690	9 ou 11	20	692
9 ou 11	17	114	9 ou 11	19	690	9 ou 11	21	692
9 ou 11	18	114	9 ou 11	20	690	9 ou 11	22	692
9 ou 11	19	114	9 ou 11	21	690	9 ou 11	1	693
9 ou 11	20	114	9 ou 11	22	690	9 ou 11	2	693
9 ou 11	21	114	9 ou 11	1	691	9 ou 11	3	693
9 ou 11	22	114	9 ou 11	2	691	9 ou 11	4	693
9 ou 11	1	189	9 ou 11	3	691	9 ou 11	5	693
9 ou 11	2	189	9 ou 11	4	691	9 ou 11	6	693
9 ou 11	3	189	9 ou 11	5	691	9 ou 11	7	693
9 ou 11	4	189	9 ou 11	6	691	9 ou 11	8	693
9 ou 11	5	189	9 ou 11	7	691	9 ou 11	9	693
9 ou 11	6	189	9 ou 11	8	691	9 ou 11	10	693
9 ou 11	7	189	9 ou 11	9	691	9 ou 11	11	693
9 ou 11	8	189	9 ou 11	10	691	9 ou 11	12	693
9 ou 11	9	189	9 ou 11	11	691	9 ou 11	13	693
9 ou 11	10	189	9 ou 11	12	691	9 ou 11	14	693
9 ou 11	11	189	9 ou 11	13	691	9 ou 11	15	693
9 ou 11	12	189	9 ou 11	14	691	9 ou 11	16	693
9 ou 11	13	189	9 ou 11	15	691	9 ou 11	17	693
9 ou 11	14	189	9 ou 11	16	691	9 ou 11	18	693

Tabela 16. Vários Fragmentos Exemplares de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 e 15.

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
9 ou 11	15	189	9 ou 11	17	691	9 ou 11	19	693
9 ou 11	16	189	9 ou 11	18	691	9 ou 11	20	693
9 ou 11	17	189	9 ou 11	19	691	9 ou 11	21	693
9 ou 11	18	189	9 ou 11	20	691	9 ou 11	22	693
9 ou 11	19	189	9 ou 11	21	691	9 ou 11	1	694
9 ou 11	20	189	9 ou 11	22	691	9 ou 11	2	694
9 ou 11	21	189	9 ou 11	1	692	9 ou 11	3	694
9 ou 11	22	189	9 ou 11	2	692	9 ou 11	4	694
9 ou 11	5	694	13	14	97	13	16	599
9 ou 11	6	694	13	15	97	13	17	599
9 ou 11	7	694	13	16	97	13	18	599
9 ou 11	8	694	13	17	97	13	19	599
9 ou 11	9	694	13	18	97	13	20	599
9 ou 11	10	694	13	19	97	13	21	599
9 ou 11	11	694	13	20	97	13	22	599
9 ou 11	12	694	13	21	97	13	1	600
9 ou 11	13	694	13	22	97	13	2	600
9 ou 11	14	694	13	1	598	13	3	600
9 ou 11	15	694	13	2	598	13	4	600
9 ou 11	16	694	13	3	598	13	5	600
9 ou 11	17	694	13	4	598	13	6	600
9 ou 11	18	694	13	5	598	13	7	600
9 ou 11	19	694	13	6	598	13	8	600
9 ou 11	20	694	13	7	598	13	9	600
9 ou 11	21	694	13	8	598	13	10	600
9 ou 11	22	694	13	9	598	13	11	600
9 ou 11	23	690	13	10	598	13	12	600
9 ou 11	23	691	13	11	598	13	13	600
9 ou 11	23	692	13	12	598	13	14	600
9 ou 11	23	693	13	13	598	13	15	600
9 ou 11	23	694	13	14	598	13	16	600
9 ou 11	115	690	13	15	598	13	17	600
9 ou 11	115	691	13	16	598	13	18	600
9 ou 11	115	692	13	17	598	13	19	600
9 ou 11	115	693	13	18	598	13	20	600
9 ou 11	115	694	13	19	598	13	21	600
9 ou 11	190	690	13	20	598	13	22	600
9 ou 11	190	691	13	21	598	13	1	601
9 ou 11	190	692	13	22	598	13	2	601

Tabela 16. Vários Fragmentos Exemplares de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 e 15.

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
9 ou 11	190	693	13	1	599	13	3	601
9 ou 11	190	694	13	2	599	13	4	601
13	1	97	13	3	599	13	5	601
13	2	97	13	4	599	13	6	601
13	3	97	13	5	599	13	7	601
13	4	97	13	6	599	13	8	601
13	5	97	13	7	599	13	9	601
13	6	97	13	8	599	13	10	601
13	7	97	13	9	599	13	11	601
13	8	97	13	10	599	13	12	601
13	9	97	13	11	599	13	13	601
13	10	97	13	12	599	13	14	601
13	11	97	13	13	599	13	15	601
13	12	97	13	14	599	13	16	601
13	13	97	13	15	599	13	17	601
13	18	601	15	12	96	15	16	598
13	19	601	15	13	96	15	17	598
13	20	601	15	14	96	15	18	598
13	21	601	15	15	96	15	19	598
13	22	601	15	16	96	15	20	598
13	1	602	15	17	96	15	21	598
13	2	602	15	18	96	15	1	599
13	3	602	15	19	96	15	2	599
13	4	602	15	20	96	15	3	599
13	5	602	15	21	96	15	4	599
13	6	602	15	1	597	15	5	599
13	7	602	15	2	597	15	6	599
13	8	602	15	3	597	15	7	599
13	9	602	15	4	597	15	8	599
13	10	602	15	5	597	15	9	599
13	11	602	15	6	597	15	10	599
13	12	602	15	7	597	15	11	599
13	13	602	15	8	597	15	12	599
13	14	602	15	9	597	15	13	599
13	15	602	15	10	597	15	14	599
13	16	602	15	11	597	15	15	599
13	17	602	15	12	597	15	16	599
13	18	602	15	13	597	15	17	599
13	19	602	15	14	597	15	18	599

Tabela 16. Vários Fragmentos Exemplares de SEQ ID NOS: 5, 9, 11, 13 e 15.

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal	SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
13	20	602	15	15	597	15	19	599
13	21	602	15	16	597	15	20	599
13	22	602	15	17	597	15	21	599
13	23	599	15	18	597	15	1	599
13	23	600	15	19	597	15	2	599
13	23	601	15	20	597	15	3	599
13	23	602	15	21	597	15	4	599
13	98	599	15	1	598	15	5	599
13	98	600	15	2	598	15	6	599
13	98	601	15	3	598	15	7	599
13	98	602	15	4	598	15	8	599
15	1	96	15	5	598	15	9	599
15	2	96	15	6	598	15	10	599
15	3	96	15	7	598	15	11	599
15	4	96	15	8	598	15	12	599
15	5	96	15	9	598	15	13	599
15	6	96	15	10	598	15	14	599
15	7	96	15	11	598	15	15	599
15	8	96	15	12	598	15	16	599
15	9	96	15	13	598	15	17	599
15	10	96	15	14	598	15	18	599
15	11	96	15	15	598	15	19	599
15	20	599	15	22	600			
15	21	599	15	22	601			
15	1	600	15	97	598			
15	2	600	15	97	599			
15	3	600	15	97	600			
15	4	600	15	97	601			
15	5	600						
15	6	600						
15	7	600						
15	8	600						
15	9	600						
15	10	600						
15	11	600						
15	12	600						
15	13	600						
15	14	600						
15	15	600						

Tabela 16. Vários Fragmentos Exemplares de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 e 15.

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
15	16	600
15	17	600
15	18	600
15	19	600
15	20	600
15	21	600
15	1	601
15	2	601
15	3	601
15	4	601
15	5	601
15	6	601
15	7	601
15	8	601
15	9	601
15	10	601
15	11	601
15	12	601
15	13	601
15	14	601
15	15	601
15	16	601
15	17	601
15	18	601
15	19	601
15	20	601
15	21	601
15	22	598
15	22	599

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
------------	-----------------------------------	-----------------------------------

SEQ ID NO:	resíduo amino-ácido de N-terminal	resíduo amino-ácido de C-terminal
------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Tabela 17. Grupos de tratamento para estudo da eficácia em equinos, testando dois níveis de dose e 2 adjuvantes diferentes (Polygen® e Carbopol)				
GRUPO	TRATAMENTO	DOSE DE ANTÍGENO	ADJUVANTE	Nº DE CAVALOS
1	Controle de célula de planta 1	NA	Carbopol	3
2	Controle de célula de planta 2	NA	Polygen®	3
3	Vacina de WNV produzida por célula de planta – Alta Dose de PM7	10 µg	Carbopol	10
4	Vacina de WNV produzida por célula de planta - Baixa Dose de PM7	1 µg	Carbopol	10
5	Vacina de WNV produzida por célula de planta – Alta Dose de PM7	10 µg	Polygen®	10
6	Vacina de WNV produzida por célula de planta – Baixa Dose de PM7	1 µg	Polygen®	10

Tabela 18. Composição de vacina para estudo da eficácia em equinos, testando dois níveis de dose e 2 adjuvantes diferentes (Polygen® e Carbopol) Cálculos de WNV para Protocolo 61004 Denota Input Requerido

Dose Alvo (ug/dose)	10				
Volume de Injeção Alvo (ul)	1000				
Volume/Vacina necessária (ml)	120			Reidratação de Antígeno	
no. inj/ml	1			Concentração Reidratada Desejada	20
				Ensaio antes da liofilização (ug/ml)	20
Soluções de Matéria-Prima				Volume Original	70
Teor de Antígeno em Massa: (ug/ml)	20	NB C2004-6A		total de ug/ frasco	1400
Matéria-Prima de Carbopol	1000	Lote CC52NAB635		Volume da Reidratação	70
Matéria-Prima de Polygen a 30%	30	MVP Lote 10011		Concentração Reidratada	20
				Total de Frascos para reidratar	1.7
				NOTAS:	
Alvos da Formulação:	ug/ml de Vac.	ug/dose			
Alto teor de Antígeno (ug/ml)	10	10		Caso não reidratar antígeno introduzir célula de ensaio de antígeno B9	
Baixo teor de Antígeno (ug/ml)	1	1			
Carbopol	4000	4000			
Polygen 30%	15	15		Os Valores de Polygen são em % em volume, o Alvo é 15% de Polygen em Vacina	
Antígeno em Branco					

Tabela 18. (continuação)

Todos os Volumes estão em ml						
Formulação	NT-1 Con- trole + Carbopol	NT-1 Controle + Polygen	Alta Dose + Carbopol	Baixa Do- se + Car- bopol	Alta Dose + Poly- gen	Baixa Dose + Polygen
Volume para produzir	120	120	120	120	120	120
NT-1 em Branco	60,000	60,000				
Alta Dose de Antígeno			60,000		60,000	
Baixa Dose de Antígeno				6,000		6,000
Matéria-Prima de Carbopol	48,000		48,000	48,000		
Matéria-Prima de Polygen a 30%		60,000			60,000	60,000
Água	12,000	0,000	12,000	66,000	0,000	54,000
Total	120,000	120,000	120,000	120,000	120,000	120,000
No. Serial	C1670-40- A	C1670- 40-B	C1670-40- C	C1670-40- D	C1670- 40-E	C1670- 40-F

Tabela 19. Propriedades Físicas de Vacinas de Estudo da Sorologia			
Série nº	Densidade @ 20 °C	pH	Osmolalidade
C1670-40-A	1,0080	7,66	222
C1670-40-B	1,0040	7,79	136
C1670-40-C	1,0088	7,41	220
C1670-40-D	1,0055	7,29	157
C1670-40-E	1,0046	7,54	127
C1670-40-F	1,0010	7,28	60
PM7 NT-1 Con- trole	1,0040	8,47	143
Antígeno em Massa	1,0057	7,97	141

Tabela 20. Títulos de Neutralização Sérica do Vírus West Nile, estudo da eficácia em equinos

Grupo no.	Cavalo no.	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42	Dia 49
1	132663371	2	2	3	4	2	2	2	2
1	133134514	2	2	2	2	2	2	2	2
1	133218532	2	2	2	3	2	2	2	2
GMT		2,0	2,0	2,3	2,9	2,0	2,0	2,0	2,0
STD		0,0	0,0	0,6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	132761220	2	2	2	3	2	2	2	2
2	133125371	2	2	2	2	2	2	2	2
2	133339624	2	2	2	2	2	2	2	2
GMT		2,0	2,0	2,0	2,3	2,0	2,0	2,0	2,0
STD		0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
3	132713454	2	13	22	21	32	32	27	32
3	132725167	2	22	46	49	89	128	49	51
3	133132466	2	2	2	4	7	22	12	14
3	133167527	2	3	22	22	54	41	32	38
3	133169647	2	2	5	6	22	21	10	9
3	133215467	2	3	6	13	21	27	16	22
3	133216291	2	6	12	16	20	25	11	1
3	133334763	2	163	326	282	101	157	89	57
3	133352724	2	2	6	18	21	18	11	9
3	133353395	2	2	6	8	20	36	24	24
GMT		2,0	5,8	13,4	18,5	29,0	37,4	21,5	22,5
STD		0,0	50,0	99,5	84,6	32,1	49,4	24,7	17,0
4	132714272	2	2	6	11	45	54	41	45
4	132724335	2	11	112	97	355	256	300	163
4	132725096	2	2	3	8	41	45	25	24
4	132752597	2	5	32	49	71	45	32	45
4	132863266	3	3	9	7	22	25	24	32
4	133125091	2	12	89	140	202	178	81	162
4	133133383	2	2	3	6	73	108	73	56
4	133133523	2	2	10	19	54	97	128	89
4	133167760	2	2	7	22	45	45	36	36
4	133213152	5	5	6	21	20	25	8	27
GMT		2,3	3,5	12,1	21,5	61,2	65,6	46,9	53,7
STD		1,0	3,8	39,6	45,4	105,7	75,6	86,7	53,2
5	132668226	2	2	3	3	16	21	4	6
5	132675665	2	2	2	3	3	4	2	2
5	132725594	2	2	2	2	3	3	2	2

Tabela 20. Títulos de Neutralização Sérica do Vírus West Nile, estudo da eficácia em equinos									
Grupo no.	Cavalo no.	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42	Dia 49
5	132844457	2	2	3	2	2	6	2	2
5	133126771	2	3	5	6	3	5	3	2
5	133131652	2	2	2	2	2	2	2	2
5	133164716	2	4	5	6	5	7	4	6
5	133223315	2	2	2	3	2	2	2	2
5	133333646	2	18	25	14	8	18	6	6
5	133349224	2	5	8	9	3	6	5	2
GMT		2,0	3,0	3,9	4,0	3,6	5,4	2,9	2,8
STD		0,0	5,0	7,1	3,9	4,4	6,6	1,5	1,9
6	132652471	2	3	6	10	9	16	10	6
6	132722692	2	2	2	3	5	7	10	4
6	132722714	2	2	3	4	10	20	6	3
6	132728113	2	2	2	9	14	22	11	22
6	132735313	2	6	7	11	10	7	6	6
6	132822260	2	3	5	6	6	7	6	4
6	133125493	2	3	5	6	7	9	5	4
6	133126691	2	2	5	10	11	14	10	12
6	133136216	2	2	2	3	4	6	3	3
6	133162564	2	2	2	45	3	6	3	5
GMT		2,0	2,5	3,5	7,5	7,2	10,1	6,4	5,5
STD		0,0	1,3	1,9	12,4	3,5	6,1	3,0	5,9

Tabela 22. Dados da Temperatura, estudo da eficácia em equinos
Temperatura pós-estímulo

[illegible]

[illegible]

Tabela 23 - 2ª Parte - continuação

Cavalo	Grupo	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10	dia 11	dia 12	dia 13	dia 14
132663371	1	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133134514	1	BAR	BAR	BAR	am - insensível e lento pm - muito insensível, fraco eutanizado	Morto	Morto	Morto	Morto
133218532	1	BAR	BAR	BAR	BAR	depressão branda	BAR	BAR	BAR
132761220	2	BAR	BAR	BAR	Tremores dos lábios, tremores de cabeça, grave fraqueza, masti- gação, eutanizado	Tremores dos lábios bran- dos, apetite reduzido	Tremores de lá- bios/cabeça, hiper- sensível, reulante para mover o pesco- ço, eutanizado	Morto	Morto
133339624	2	BAR	BAR	BAR	BAR	Morto	Morto	Morto	Morto
133167527	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133353395	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133334763	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133169647	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133132466	3	hipersensível	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133215467	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133352724	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
132725167	3	letárgico	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
132713454	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133216291	3	BAR	BAR	BAR	BAR	ligeira hiper- sensibilidade	BAR	BAR	BAR

Tabela 24. Achados ao Exame Histológico, estudo da eficácia em equinos			
Cavalo	Grupo	Eutanizado Dia	Achados Histológicos
132663371	1	15	encefalite branda a moderada em ambas as seções
133134514	1	10	encefalite grave em ambas as seções
133218532	1	14	encefalite moderada a grave em ambas as seções
132761220	2	12	encefalite grave em ambas as seções
133339624	2	10	encefalite grave em ambas as seções
133167527	3	17	normal
133353395	3	17	encefalite branda em uma seção
133334763	3	14	encefalite branda em uma seção
133169647	3	14	Normal
133132466	3	17	encefalite branda em ambas as seções
133215467	3	14	encefalite branda em ambas as seções
133352724	3	15	encefalite branda em uma seção
132725167	3	14	normal
132713454	3	17	encefalite branda em uma seção
133216291	3	15	encefalite moderada em ambas as seções

REFERÊNCIAS

- Patente dos Estados Unidos nº 5.773.689
- Patente dos Estados Unidos nº 5.773.695
- Patente dos Estados Unidos nº 6.239.328
- 5 Patente dos Estados Unidos nº 5.879.903
- Patente dos Estados Unidos nº 5.637.489
- Patente dos Estados Unidos nº 5.276.268
- Patente dos Estados Unidos nº 5.273.894
- Patente dos Estados Unidos nº 5.478.925
- 10 Patente dos Estados Unidos nº 5.073.627
- Patente dos Estados Unidos nº 6.121.424
- Patente dos Estados Unidos nº 5.843.464
- Patente dos Estados Unidos nº 5.750.352
- Patente dos Estados Unidos nº 5.990.275
- 15 Patente dos Estados Unidos nº 6.342.362
- Patente dos Estados Unidos nº 6.524.825
- Patente dos Estados Unidos nº 6.419.931
- Patente dos Estados Unidos nº 5.712.170
- Patente dos Estados Unidos nº 5.183.740
- 20 Patente dos Estados Unidos nº 4.816.567
- Patente dos Estados Unidos nº 5.380.831
- Patente dos Estados Unidos nº 5.436.391
- Patente dos Estados Unidos nº 6.319.691
- Patente dos Estados Unidos nº 6.277.375
- 25 Patente dos Estados Unidos nº 5.643.570
- Patente dos Estados Unidos nº 5.565.335
- Patente dos Estados Unidos nº 5.561.071
- Patente dos Estados Unidos nº 5.753.439
- Patente dos Estados Unidos nº 6.214.545
- 30 Patente dos Estados Unidos nº 5.384.253
- Patente dos Estados Unidos nº 5.428.147
- Publicação do Pedido de Patente dos Estados Unidos nº

2004/0268442 A1

Patente Européia nº EP 404.097

Publicação de Patente Internacional WO Nº 93/11161

Publicação de Patente Internacional WO Nº 94/10308

5 Publicação de Patente Internacional WO Nº 94/07902

Publicação de Patente Internacional WO Nº 97/27207

Publicação de Patente Internacional WO Nº 98/49305

Publicação de Patente Internacional WO Nº 91/09957

Altendorf *et al.* (1999-WWW, 2000) "Structure and Function of
10 the F_o Complex of the ATP Synthase from *Escherichia Coli*" *J. of Experimental Biology* 203:19-28.

Altschul, S. F. *et al.* (1990) "Basic Local Alignment Search Tool"
J. Mol. Biol. 215(3):403-410.

Alwine, J. C. *et al.* (1977) "Method for detection of specific RNAs
15 in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5350-5354.

An, G. (1985) "High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells" *Plant Physiol.*, 79:568-570.

Ausubel, M. *et al.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*,
20 John Wiley and Sons, New York, NY.

Ausubel, M. *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*,
Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

Baneyx, F. (1999) "Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*" *Biotechnology* 10:411-21.

25 Barker, R. F. *et al.* (1983) "Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955" *Plant Molecular Biology* 2:335-350.

Beasley, D. W., and A. D. Barrett (2002) "Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein"
30 *J Virol* 76:13097-13100.

Beltz, G. *et al.* (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods" *Methods of Enzymol-*

ogy, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285.

Benoist, C., Chambon, P. (1981) "In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region" *Nature* 290:304-310.

5 Berchtold, M. W. (1989) "A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo(dT) in a polymerase chain reaction (PCR)" *Nuc. Acids. Res.* 17:453.

Bianchi, N. *et al.* (1997) "Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction" *Clin. Diagn. Virol.* 8(3):199-208.

Blitvich, B. J. *et al.* (2003) "Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species" *J. Clin. Microbiol.* 41(3):1041-1047.

15 Bray, M., B. T. Zhao, L. Markoff, K. H. Eckels, R. M. Chanock, and C. J. Lai (1989) "Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis" *J Virol* 63:2853-2856.

20 Bressanelli, S., K. Stiasny, S. L. Allison, E. A. Stura, S. Duquero, J. Lescar, F. X. Heinz, and F. A. Rey (2004) "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation" *Embo J* 23:728-738.

25 Brinster, R. L. *et al.* (1982) "Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs" *Nature* 296:39-42.

Callis, J. *et al.* (1995) "Structure and Evolution of Genes Encoding Polyubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia" *Genetics* 139(2):921-939.

30 Cammack, N., and E. A. Gould (1986) "Topographical analysis of epitope relationships on the envelope glycoprotein of yellow fever 17D vaccine and the wild type Asibi parent virus" *Virology* 150:333-341.

Capecchi, M. R. (1980) "High efficiency transformation by direct

microinjection of DNA into cultured mammalian cells" *Cell* 22(2):479-488.

Cecilia, D., and E. A. Gould (1991) "Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants" *Virology* 181:70-77.

5 Clackson, T. *et al.* (1991) "Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries" *Nature* 352:624-628.

Clapp, J. F. (1993) "Somatic gene therapy into hematopoietic cells. Current status and future implications" *Clin. Perinatol.* 20(1):155-168.

10 Curiel, D. T. *et al.* (1991) "Adenovirus Enhancement of Transferin-Polylysine-Mediated Gene Delivery" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(19):8850-8854.

15 Curiel, D. T. *et al.* (1992) "High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes" *Hum. Gen. Ther.* 3(2):147-154.

deBoer, H. A. *et al.* (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80(1):21-25.

20 Doran, P. M. (2000) "Foreign protein production in plant tissue cultures" *Current Opinions in Biotechnology*, 11:199-204.

Eglitis, M. A. *et al.* (1988) "Retroviral-mediated gene transfer into hemopoietic cells" *Adv. Exp. Med. Biol.* 241:19-27.

Eglitis, M. A., Anderson, W. F. (1988) "Retroviral Vectors for Introduction of Genes into Mammalian Cells" *Biotechniques* 6(7):608-614.

25 Eihauer, A. *et al.* (2001) "The FLAG™ Peptide, a Versatile Fusion Tag for the Purification of Recombinant Proteins" *J. Biochem Biophys Methods* 49:455-65.

30 Fischer, R. *et al.* (1999) "Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments" *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:109-112.

Fraley, R. T. *et al.* (1985) "The SEV system: A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation" *Biotechnology* 3:629-635.

Fromm, M. *et al.* (1985) "Expression of Genes Transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(17):5824-5828.

Fynan, E. F. *et al.* (1993) "DNA Vaccines: Protective Immunizations by Parenteral, Mucosal, and Gene-Gun Inoculations" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24):11478-11482.

Gao, G. F., M. H. Hussain, H. W. Reid, and E. A. Gould (1994) "Identification of naturally occurring monoclonal antibody escape variants of louping ill virus" *J Gen Virol* 75 (Pt 3):609-614.

10 Gardner, R. C. *et al.* (1981) "The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing" *Nucl. Acids Res.* 9(12):2871-2888.

Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1973) "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5" *Virology* 54(02):536-539.

15 Gish, W. *et al.* (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" *Nature Genetics* 3:266-272.

Guirakhoo, F., F. X. Heinz, and C. Kunz (1989) "Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH" *Virology* 169:90-99.

20 Hanna, Sheri L, Theodore C. Pierson, Melissa D. Sanchez, Asim A. Ahmed, Mariam M. Murtadha, and Robert W. Doms (2005) "N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity" *J Virol.* 79:13262-13274.

25 Hasegawa, H., M. Yoshida, T. Shiosaka, S. Fujita, and Y. Kobayashi (1992) "Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice" *Virology* 191:158-165.

30 Heinz, F., and C. Kunz (1977) "Characterization of tick-borne encephalitis virus and immunogenicity of its surface components in mice" *Acta Virol* 21:308-316.

Heinz, F. X. (1986) "Epitope mapping of flavivirus glycoproteins"

Adv Virus Res 31:103-168.

Heinz, F. X., R. Berger, W. Tuma, and C. Kunz (1983) "A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein of tick-borne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies" *Virology* 126:525-537.

Heinz, F. X., and C. Kunz (1982) "Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses" *J Gen Virol* 62 (Pt 2):271-285.

Heinz, F. X., C. W. Mandl, H. Holzmann, C. Kunz, B. A. Harris, F. Rey, and S. C. Harrison (1991) "The flavivirus envelope protein E: isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallization" *J Virol* 65:5579-5583.

Heinz, F. X., and J. T. Roehrig (1990) *Flaviviruses*, p. 289–305, *Immunochemistry of viruses*, vol. II. Elsevier, Amsterdam–New York–Oxford.

Herrera-Estrella, L. *et al.* (1983) "Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector" *Nature* 303:209-213.

Herrera-Estrella, L. *et al.* (1984) "Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector" *Nature* 310:115-120.

Higgins, D. G. *et al.* (1996) "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments" *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Holliger, P. *et al.* (1993) "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

Holzmann, H., K. Stiasny, M. Ecker, C. Kunz, and F. X. Heinz (1997) "Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice" *J Gen Virol* 78 (Pt 1):31-37.

Holzmann, H., G. Utter, E. Norrby, C. W. Mandl, C. Kunz, and F. X. Heinz (1993) "Assessment of the antigenic structure of tick-borne encephalitis virus by the use of synthetic peptides" *J Gen Virol* 74 (Pt 9):2031-

2035.

Jan, L. R., C. S. Yang, L. S. Henchal, H. Sumiyoshi, P. L. Summers, D. R. Dubois, and C. J. Lai (1993) "Increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice by strategic carboxyl-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein" *Am J Trop Med Hyg* 48:412-423.

Jefferson, R.A. (1987) "Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system" *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405.

Jiang, W. R., A. Lowe, S. Higgs, H. Reid, and E. A. Gould (1993) "Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence" *J Gen Virol* 74 (Pt 5):931-935.

Johnston, S. A., Tang, D. C. (1994) "Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization" *Methods Cell. Biol.* 43(A):353-365.

Jones, C. *et al.* (1995) "Current Trends in Molecular Recognition and Bioseparation" *J. of Chromatography A.* 707:3-22.

Jorgensen, R. A. *et al.* (1987) T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives" *Mol. Gen. Genet.* 207:471-477.

Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M, Fikrig E, Koski RA, Modis Y. (2006) "Crystal structure of West Nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes" *J Virol.* Aug 30; [Epub ahead of print]

Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY., pp. 169-170.

Kohler, G. *et al.* (1975) "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity" *Nature* 256(5517):495-497.

Kolaskar, A. S., and U. Kulkarni-Kale (1999) "Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus" *Virology* 261:31-42.

Konishi, E., S. Pincus, E. Paoletti, R. E. Shope, T. Burrage, and P. W. Mason (1992) "Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal

JEV infection" *Virology* 188:714-720.

Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Cor-
 ver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. S-
 trauss, T. S. Baker, and J. H. Strauss (2002) "Structure of dengue virus: im-
 5 plications for flavivirus organization, maturation, and fusion" *Cell* 108:717-
 725.

Kusterbeck, A. W. *et al.* (1990a) "A Continuous Flow Immunoas-
 say for Rapid and Sensitive Detection of Small Molecules" *Journal of Immu-
 nological Methods* 135(1-2):191-197.

10 Kusterbeck, A. W. *et al.* (1990) "Antibody-Based Biosensor for
 Continuous Monitoring" In Biosensor Technology, R. P. Buck *et al.*, eds.,
 Marcel Dekker, N.Y. pp. 345-350.

Lee, E., and M. Lobigs (2000) "Substitutions at the putative re-
 ceptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell
 15 tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry" *J Virol* 74:8867-
 8875.

Letchworth, G. J. and J. A. Appleton (1984) *Methods for Produc-
 tion of Monoclonal Antibodies*. USDA Handbook #630.

Ligler, F. S. *et al.* (1992) "Drug Detection Using the Flow Im-
 20 munosensor" In Biosensor Design and Application, J. Findley *et al.*, eds.,
 American Chemical Society Press, pp. 73-80.

Lin, B., C. R. Parrish, J. M. Murray, and P. J. Wright (1994) "Lo-
 calization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus
 type 2" *Virology* 202:885-890.

25 Lu, L. *et al.* (1993) "High efficiency retroviral mediated gene
 transduction into single isolated immature and replatable CD34 (3+) hemato-
 poietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood" *J. Exp. Med.*
 178(6):2089-2096.

Mandl, C. W., F. Guirakhoo, H. Holzmann, F. X. Heinz, and C.
 30 Kunz (1989) "Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the
 molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model" *J Virol*
 63:564-571.

Maniatis, J.-M. *et al.* (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Marcotte, W. R. *et al.* (1988) "Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts" *Nature* 335:454-457.

5 Margolin, W. (2000) "Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells" *Methods* 20:62-72.

Marks, J. D. *et al.* (1991) "By-Passing Immunization: Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage" *J. Mol. Biol.* 222(3):581-597.

10 Mason, P. W., J. M. Dalrymple, M. K. Gentry, J. M. McCown, C. H. Hoke, D. S. Burke, M. J. Fournier, and T. L. Mason (1989) "Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein" *J Gen Virol* 70 (Pt 8):2037-2049.

15 Mason, P. W., S. Pincus, M. J. Fournier, T. L. Mason, R. E. Shope, and E. Paoletti (1991) "Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection" *Virology* 180:294-305.

20 Melton, D. A. *et al.* (1984) "Efficient In Vitro Synthesis of Biologically Active RNA and RNA Hybridization Probes From Plasmids Containing a Bacteriophage SP6 Promoter" *Nuc. Acids Res.* 12:7035-7036.

25 Men, R. H., M. Bray, and C. J. Lai (1991) "Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice" *J Virol* 65:1400-1407.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S. C. (2004) "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion" *Nature* 427:313-319.

30 Morrison, S. L. *et al.* (1984) "Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains with Human Constant Region Domains" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855.

Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann,

and R. J. Kuhn (2003) "Structure of West Nile virus" *Science* 302:248.

Murai *et al.* (1982) "T-DNA of pTi-15955 from *Agrobacterium tumefaciens* is transcribed into a minimum of seven polyadenylated RNAs in a sunflower crown gall tumor" *Nucleic Acids Res.* 10(5):1679-1689.

5 Murray, E. E. *et al.* (1989) "Codon usage in plant genes" *Nucleic Acids Res.* 17(2):477-498.

Norris, S. R. *et al.* (1993) "The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression" *Plant Mol. Biol.* 21(5):895-906.

10 Nowak, T., and G. Wengler (1987) "Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus" *Virology* 156:127-137.

Ogert, R. A. *et al.* (1992) "Detection of Cocaine Using the Flow Immunosensor" *Analytical Letters* 25:1999-2019.

Pearson, W. R. *et al.* (1988) "Improved Tools for Biological Sequence Comparison" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448.

Pietu, G. *et al.* (1996) "Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array" *Genome Research* 6(6):492-503.

20 Pincus, S., P. W. Mason, E. Konishi, B. A. Fonseca, R. E. Shope, C. M. Rice, and E. Paoletti (1992) "Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis" *Virology* 187:290-297.

25 Pluckthun, A. (1994) In The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113:269-315, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York.

Potrykus, I. *et al.* (1985) "Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot" *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188.

30 Puig, O. *et al.* (2001) "The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification" *Methods* 24:218-29.

Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison (1995) "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A

resolution" *Nature* 375:291-298.

Roehrig, J. T., J. H. Mathews, and D. W. Trent (1983) "Identification of epitopes on the E glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies" *Virology* 128:118-126.

- 5 Roehrig, J. T. (1986) The use of monoclonal antibodies in studies of the structural proteins of togaviruses and flaviviruses, p. 251–278. *In* S. Schlesinger and M. J. Schlesinger (ed.), *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, New York.

- 10 Roehrig, J. T., A. R. Hunt, A. J. Johnson, and R. A. Hawkes (1989) "Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody" *Virology* 171:49-60.

- 15 Rogers, S. G. *et al.* (1987) "Improved Vector for plant transformation: expression cassette vectors and new selectable markers" *Meth. in Enzymol.* 153:253-277.

Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57.

- 20 Sanchez, M. D., T. C. Pierson, D. McAllister, S. L. Hanna, B. A. Puffer, L. E. Valentine, M. M. Murtadha, J. A. Hoxie, and R. W. Doms (2005) "Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus" *Virology* 336:70-82.

Sassenfeld, H. M. (1990) "Engineering Proteins for Purification" *TibTech* 8:88-93.

- 25 Schena, M. *et al.* (1995) "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns With a Complementary DNA Microarray" *Science* 270:467-470.

Schena, M. *et al.* (1996a) "Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(20):10614-10619.

- 30 Schena, M. (1996b) "Genome analysis with gene expression microarrays" *BioEssays* 18(5):427-431.

Schlesinger, J. J., J. R. Putnak, and K. H. Eckels (1992) "New

approaches to flavivirus vaccine development" *Biotechnology* 20:289-307.

Sheibani, N. (1999) "Prokaryotic Gene Fusion Expression Systems and Their Use in Structural and Functional Studies of Proteins" *Prep. Biochem. & Biotechnol.* 29(1):77-90.

5 Skerra, A. *et al.* (1999) "Applications of a Peptide Ligand for Streptavidin: the *Strep-tag*" *Biomolecular Engineering* 16:79-86.

Smith, C. (1998) "Cookbook for Eukaryotic Protein Expression: Yeast, Insect, and Plant Expression Systems" *The Scientist* 12(22):20.

10 Smith, G. L. and B. Moss (1984) "Vaccinia Virus expression Vectors: Construction, Properties, and applications" *Bio Techniques* Nov/Dec:306-312.

Smyth, G. K. *et al.* (2000) "Eukaryotic Expression and Purification of Recombinant Extracellular Matrix Proteins Carrying the Strep II Tag" *Methods in Molecular Biology* 139:49-57.

15 Spielmann, A. *et al.* (1986) "T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites" *Mol. Gen. Genet.* 205:34-41.

20 Stiasny, K., S. L. Allison, A. Marchler-Bauer, C. Kunz, and F. X. Heinz (1996) "Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus" *J Virol* 70:8142-8147.

Suggs, S. V. *et al.* (1981) *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.

25 Sun C.-W. *et al.* (1997) "Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes" *Plant J.* 11(5):1017-1027.

30 Sutter, G. *et al.* (1994) "A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus" *Vaccine* 12(11):1032-1040.

Sutter, G., Moss, B. (1992) "Nonreplicating Vaccinia Vector Efficiently Expresses Recombinant Genes" *Proc. Nat'l. Acad. Sci U.S.A.*

89:10847-10851.

Thompson, J. *et al.* (1994) "Clustal-W: *improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice*" *Nucleic Acids Res.*
 5 22(2):4673-4680.

Unger, T. F. (1997) "Show Me the Money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems" *The Scientist* 11(17):20.

Villa-Kamaroff, L. *et al.* (1978) "A bacterial clone synthesizing proinsulin" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75(8):3727-3731.

10 Wagner, M. J. *et al.* (1981) "Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(3):1441-1445.

Wagner, E. *et al.* (1992) "Coupling of Adenovirus to Transferrin-Polylysine/DNA Complexes Greatly Enhances Receptor-Mediated Gene Delivery and Expression of Transfected Genes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
 15 89(13):6099-6103.

Wei, C. F. *et al.* (1983) "Isolation and comparison of two molecular species of the BAL 31 nuclease from *Alteromonas espejiana* with distinct kinetic properties" *J. Biol. Chem.* 258:13506-13512.

20 Wengler, G., and G. Wengler (1989) "An analysis of the antibody response against West Nile virus E protein purified by SDS-PAGE indicates that this protein does not contain sequential epitopes for efficient induction of neutralizing antibodies" *J Gen Virol* 70 (Pt 4):987-992.

Winkler, G., F. X. Heinz, and C. Kunz (1987) "Characterization of
 25 a disulphide bridge-stabilized antigenic domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein" *J Gen Virol* 68 (Pt 8):2239-2244.

Wong, T. K., Neumann, E. (1982) Electric field mediated gene transfer" *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 107(2):584-587.

Yamamoto, T. *et al.* (1980) "Identification of a functional promoter
 30 in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus" *Cell* 22(3):787-797.

Zapata, G. *et al.* (1995) "Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in *Escherichia coli* and enhanced antiproliferative activity"

Protein Eng. 8(10):1057-1062.

Zatloukal, K. *et al.* (1992) "Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:136-153.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Smith, Kelley
 Mihaliak, Charles A.
 Webb, Steven Robert
 5 Merlo, Donald J.
 Evans, Steven L.
 Letchworth, Geoffrey J.
 <120> Vacinas de Vírus West Nile (WNV) Produzidas por Plantas, Vetores
 e Sequências Optimizadas de Códon de Plantas
 10 <130> DAS-139X
 <150> US 60/871.518
 <151> 22/12/2006
 <160> 15
 <170> PatentIn versão 3.3
 15 <210> 1
 <211> 2004
 <212> DNA
 <213> vírus West Nile
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(2004)
 <400> 1
 gtt acc ctc tct aac ttc caa ggg aag gtg atg atg acg gta aat gct 48
 Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala
 25 1 5 10 15
 act gac gtc aca gat gtc atc acg att cca aca gct gct gga aag aac 96
 Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn
 20 25 30
 cta tgc att gtc aga gca atg gat gtg gga tac atg tgc gat gat act 144
 30 Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr
 35 40 45
 atc act tat qaa tgc cca gtg ctg tcg act ggt aat gat cca gaa gac 192

	Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp	
	50 55 60	
	atc gac tgt tgg tgc aca aag tca gca gtc tac gtc agg tat gga aga	240
	Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg	
5	65 70 75 80	
	tgc acc aag aca cgc cac tca aga cgc agt cgg agg tca ctg aca gtg	288
	Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val	
	85 90 95	
	cag aca cac gga gaa agc act cta gcg aac aag aag ggg gct tgg atg	336
10	Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met	
	100 105 110	
	gac agc acc aag gcc aca agg tat ttg gta aaa aca gaa tca tgg atc	384
	Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile	
	115 120 125	
15	ttg agg aac cct gga tat gcc ctg gtg gca gcc gtc att ggt tgg atg	432
	Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met	
	130 135 140	
	ctt ggg agc aac acc atg cag aga gtt gtg ttt gtc gtg cta ttg ctt	480
	Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu	
20	145 150 155 160	
	ttg gtg gcc cca gct tac agc ttc aac tgc ctt gga atg agc aac aga	528
	Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg	
	165 170 175	
	gac ttc ttg gaa gga gtg tct gga gca aca tgg gtg gat ttg gtt ctc	576
25	Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu	
	180 185 190	
	gaa ggc gac agc tgc gtg act atc atg tct aag gac aag cct acc atc	624
	Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile	
	195 200 205	
30	gat gtg aag atg atg aat atg gag gcg gcc aac ctg gca gag gtc cgc	672
	Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg	
	210 215 220	

	agt tat tgc tat ttg gct acc gtc agc gat ctc tcc acc aaa gct gcg	720
	Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala	
	225 230 235 240	
	tgc ccg acc atg gga gaa gct cac aat gac aaa cgt gct gac cca gct	768
5	Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala	
	245 250 255	
	ttt gtg tgc aga caa gga gtg gtg gac agg ggc tgg ggc aac ggc tgc	816
	Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys	
	260 265 270	
10	gga cta ttt ggc aaa gga agc att gac aca tgc gcc aaa ttt gcc tgc	864
	Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys	
	275 280 285	
	tct acc aag gca ata gga aga acc atc ttg aaa gag aat atc aag tac	912
	Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr	
15	290 295 300	
	gaa gtg gcc att ttt gtc cat gga cca act act gtg gag tcg cac gga	960
	Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly	
	305 310 315 320	
	aac tac tcc aca cag gtt gga gcc act cag gca ggg aga ttc agc atc	1008
20	Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile	
	325 330 335	
	act cct gcg gcg cct tca tac aca cta aag ctt gga gaa tat gga gag	1056
	Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu	
	340 345 350	
25	gtg aca gtg gac tgt gaa cca cgg tca ggg att gac acc aat gca tac	1104
	Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr	
	355 360 365	
	tac gtg atg act gtt gga aca aag acg ttc ttg gtc cat cgt gag tgg	1152
	Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp	
30	370 375 380	
	ttc atg gac ctc aac ctc cct tgg agc agt gct gga agt act gtg tgg	1200
	Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp	

	385	390	395	400	
	agg aac aga gag acg tta atg gag ttt gag gaa cca cac gcc acg aag				1248
	Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys				
		405	410	415	
5	cag tct gtg ata gca ttg ggc tca caa gag gga gct ctg cat caa gct				1296
	Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala				
		420	425	430	
	ttg gct gga gcc att cct gtg gaa ttt tca agc aac act gtc aag ttg				1344
	Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu				
10		435	440	445	
	acg tcg ggt cat ttg aag tgt aga gtg aag atg gaa aaa ttg cag ttg				1392
	Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu				
		450	455	460	
	aag gga aca acc tat ggc gtc tgt tca aag gct ttc aag ttt ctt ggg				1440
15	Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly				
		465	470	475	480
	act ccc gca gac aca ggt cac ggc act gtg gtg ttg gaa ttg cag tac				1488
	Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr				
		485	490	495	
20	act ggc acg gat gga cct tgc aaa gtt cct atc tcg tca gtg gct tca				1536
	Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser				
		500	505	510	
	ttg aac gac cta acg cca gtg ggc aga ttg gtc act gtc aac cct ttt				1584
	Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe				
25		515	520	525	
	gtt tca gtg gcc acg gcc aac gct aag gtc ctg att gaa ttg gaa cca				1632
	Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro				
		530	535	540	
	ccc ttt gga gac tca tac ata gtg gtg ggc aga gga gaa caa cag atc				1680
30	Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile				
		545	550	555	560
	aat cac cat tgg cac aag tct gga agc agc att ggc aaa gcc ttt aca				1728

Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr
 565 570 575
 acc acc ctc aaa gga gcg cag aga cta gcc gct cta gga gac aca gct 1776
 Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala
 5 580 585 590
 tgg gac ttt gga tca gtt gga ggg gtg ttc acc tca gtt ggg aag gct 1824
 Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala
 595 600 605
 gtc cat caa gtg ttc gga gga gca ttc cgc tca ctg ttc gga ggc atg 1872
 10 Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met
 610 615 620
 tcc tgg ata acg caa gga ttg ctg ggg gct ctc ctg ttg tgg atg ggc 1920
 Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly
 625 630 635 640
 15 atc aat gct cgt gat agg tcc ata gct ctc acg ttt ctc gca gtt gga 1968
 Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly
 645 650 655
 gga gtt ctg ctc ttc ctc tcc gtg aac gtg cac gct 2004
 Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His Ala
 20 660 665
 <210> 2
 <211> 668
 <212> PRT
 <213> virus West Nile
 25 <400> 2
 Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala
 1 5 10 15
 Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn
 20 25 30
 30 Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr
 35 40 45
 Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp

	50	55	60	
	Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg			
	65	70	75	80
	Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val			
5	85	90	95	
	Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met			
	100	105	110	
	Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile			
	115	120	125	
10	Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met			
	130	135	140	
	Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu			
	145	150	155	160
	Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg			
15	165	170	175	
	Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu			
	180	185	190	
	Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile			
	195	200	205	
20	Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg			
	210	215	220	
	Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala			
	225	230	235	240
	Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala			
25	245	250	255	
	Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys			
	260	265	270	
	Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys			
	275	280	285	
30	Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr			
	290	295	300	
	Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly			

	305	310	315	320
	Asn	Tyr	Ser	Thr
	Gln	Val	Gly	Ala
	Thr	Gln	Ala	Gly
	Arg	Phe	Ser	Ile
	325	330	335	
	Thr	Pro	Ala	Ala
	Pro	Ser	Tyr	Thr
	Leu	Lys	Leu	Gly
	Glu	Tyr	Gly	Glu
5	340	345	350	
	Val	Thr	Val	Asp
	Cys	Glu	Pro	Arg
	Ser	Gly	Ile	Asp
	Thr	Asn	Ala	Tyr
	355	360	365	
	Tyr	Val	Met	Thr
	Val	Gly	Thr	Lys
	Thr	Phe	Leu	Val
	His	Arg	Glu	Trp
	370	375	380	
10	Phe	Met	Asp	Leu
	Asn	Leu	Pro	Trp
	Ser	Ser	Ala	Gly
	Ser	Thr	Val	Trp
	385	390	395	400
	Arg	Asn	Arg	Glu
	Thr	Leu	Met	Glu
	Phe	Glu	Glu	Pro
	His	Ala	Thr	Lys
	405	410	415	
	Gln	Ser	Val	Ile
	Ala	Leu	Gly	Ser
	Gln	Glu	Gly	Ala
	Leu	His	Gln	Ala
15	420	425	430	
	Leu	Ala	Gly	Ala
	Ile	Pro	Val	Glu
	Phe	Ser	Ser	Asn
	Thr	Val	Lys	Leu
	435	440	445	
	Thr	Ser	Gly	His
	Leu	Lys	Cys	Arg
	Val	Lys	Met	Glu
	Lys	Leu	Gln	Leu
	450	455	460	
20	Lys	Gly	Thr	Thr
	Tyr	Gly	Val	Cys
	Ser	Lys	Ala	Phe
	Lys	Phe	Leu	Gly
	465	470	475	480
	Thr	Pro	Ala	Asp
	Thr	Gly	His	Gly
	Thr	Val	Val	Leu
	Glu	Leu	Gln	Tyr
	485	490	495	
	Thr	Gly	Thr	Asp
	Gly	Pro	Cys	Lys
	Val	Pro	Ile	Ser
	Ser	Ser	Val	Ala
	Ser			
25	500	505	510	
	Leu	Asn	Asp	Leu
	Thr	Pro	Val	Gly
	Arg	Leu	Val	Thr
	Val	Asn	Pro	Phe
	515	520	525	
	Val	Ser	Val	Ala
	Thr	Ala	Asn	Ala
	Lys	Val	Leu	Ile
	Glu	Leu	Glu	Pro
	530	535	540	
30	Pro	Phe	Gly	Asp
	Ser	Tyr	Ile	Val
	Val	Val	Gly	Arg
	Gly	Glu	Gln	Gln
	Ile			
	545	550	555	560
	Asn	His	His	Trp
	His	Lys	Ser	Gly
	Ser	Ser	Ile	Gly
	Lys	Ala	Phe	Thr

	565	570	575
	Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala		
	580	585	590
	Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala		
5	595	600	605
	Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met		
	610	615	620
	Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly		
	625	630	635
10	Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly		
	645	650	655
	Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His Ala		
	660	665	
	<210>	3	
15	<211>	2004	
	<212>	DNA	
	<213>	virus West Nile	
	<400>	3	
	gtgactctga gcaactttca aggaaagggtc atgatgactg tcaatgcaac tgatgtcact	60	
20	gatgtgataa caatcccaac agcagctggg aagaatcttt gcattgtcag agctatggat	120	
	gtgggctaca tgtgtgatga cacaatcact tatgagtgtc cagtactttc tgctggaaat	180	
	gatcctgaag acattgattg ttggtgcacc aaatcagctg tctatgttcg ttatgggagg	240	
	tgacaaaaga ccagacactc acgaagaagt cgaagggtccc tgacagtgca aactcatgga	300	
	gagtcaactt tggccaacaa gaaaggcgca tggatggatt ctaccaaagc aacaagatat	360	
25	cttgtcaaaa ctgagtcatt gattcttagg aatcctggat atgctttagt tgcagctgtc	420	
	attggatgga tgcttggtgc caataccatg cagagagttg tcttcgtagt tctgttggtta	480	
	cttgtagctc cagcttactc attcaactgt cttggaatga gcaataggga tttccttgaa	540	
	ggtgtttccg gtgcaacatg ggttgatctt gtcttagaag gagattcatg tgtgacaatc	600	
	atgtccaaag acaagccaac cattgatgtc aagatgatga acatggaagc tgccaatctt	660	
30	gcagaagtta ggtcttactg ctatctggca acagtgagtg atttgtcaac aaaagctgcc	720	
	tgtcccacaa tgggagaggc tcacaatgac aaacgtgctg atcctgcatt tgtatgcaga	780	
	caaggagttg tagacagagg ttgggggaaat ggttgtggtc tctttggcaa aggcagcatt	840	

	gacacttgtg caaagtttgc ttgcagcacc aaagcaattg gtcgaaccat attgaaagag	900
	aacattaagt atgaagttgc catctttgtt catgggtccaa caactgtgga atctcatggc	960
	aattacagca cacaagttgg tgccacccaa gctgggaggt tttcaatcac tcctgctgct	1020
	ccaagttaca ctctgaaatt ggggtgaatat ggtgaagtaa cagttgattg tgaacctagg	1080
5	tctggcattg acaccaatgc ttactatgta atgactgtgg gaacaaagac attcttagtt	1140
	cacagagaat ggttcatgga tttgaatctc ccttggagtt ctgctggaag cactgtttgg	1200
	aggaatcgtg aaacattgat ggagtttgag gaaccacatg caacaaaaca gtcagtaata	1260
	gcattgggca gtcaagaggg agcattacat caagccttgg ctggggcaat tcctgttgag	1320
	tttagttcca aactgtgaa actgacaagt ggtcatctga aatgcagagt aaagatggag	1380
10	aagttacagt tgaaaggaac cacttatggg gtttgttcca aagccttcaa gtttcttgga	1440
	actcctgctg aactgggtca tgggactgtg gttttggaat tgcagtacac tggcactgat	1500
	ggtccatgca aggttcccat aagcagtgtt gcttcaactca atgatctcac tccagtaggc	1560
	agacttgtag cagtcaaccc ctttgtttct gttgcaactg ccaatgcaaa ggtgctcata	1620
	gaattggagc ctccatttgg tgattcttac attgtttag gtagaggaga gcaacagatc	1680
15	aaccatcact ggcacaaatc tggttcttca attggcaaag ccttcacaac cactctcaaa	1740
	ggggcacaga gacttgctgc tttaggagac actgcatggg atttcggatc tgttggaggt	1800
	gttttcacct ctgtgggaaa ggctgtgcat caagtttttg gtggggcttt tcgatccttg	1860
	tttggtggaa tgtcttggat aactcaaggt cttttagggg ctctgctttt gtggatgggc	1920
	atcaatgcaa gggacagatc aattgcctta accttccttg cagttggagg tgttcttctc	1980
20	tttctctctg taaatgttca tgct	2004
	<210> 4	
	<211> 2004	
	<212> DNA	
	<213> virus West Nile	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1) .. (2004)	
	<400> 4	
	gtg act ctg agc aac ttt caa gga aag gtc atg atg act gtc aat gca	48
30	Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala	
	1 5 10 15	
	act gat gtc act gat gtg ata aca atc cca aca gca gct ggg aag aat	96

Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn
 20 25 30
 ctt tgc att gtc aga gct atg gat gtg ggc tac atg tgt gat gac aca 144
 Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr
 5 35 40 45
 atc act tat gag tgt cca gta ctt tct gct gga aat gat cct gaa gac 192
 Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp
 50 55 60
 att gat tgt tgg tgc acc aaa tca gct gtc tat gtt cgt tat ggg agg 240
 10 Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg
 65 70 75 80
 tgc aca aag acc aga cac tca cga aga agt cga agg tcc ctg aca gtg 288
 Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val
 85 90 95
 15 caa act cat gga gag tca act ttg gcc aac aag aaa ggc gca tgg atg 336
 Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met
 100 105 110
 gat tct acc aaa gca aca aga tat ctt gtc aaa act gag tca tgg att 384
 Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile
 20 115 120 125
 ctt agg aat cct gga tat gct tta gtt gca gct gtc att gga tgg atg 432
 Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met
 130 135 140
 ctt ggg tcc aat acc atg cag aga gtt gtc ttc gta gtt ctg ttg tta 480
 25 Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu
 145 150 155 160
 ctt gta gct cca gct tac tca ttc aac tgt ctt gga atg agc aat agg 528
 Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg
 165 170 175
 30 gat ttc ctt gaa ggt gtt tcc ggt gca aca tgg gtt gat ctt gtc tta 576
 Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu
 180 185 190

	gaa gga gat tca tgt gtg aca atc atg tcc aaa gac aag cca acc att	624
	Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile	
	195 200 205	
	gat gtc aag atg atg aac atg gaa gct gcc aat ctt gca gaa gtt agg	672
5	Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg	
	210 215 220	
	tct tac tgc tat ctg gca aca gtg agt gat ttg tca aca aaa gct gcc	720
	Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala	
	225 230 235 240	
10	tgt ccc aca atg gga gag gct cac aat gac aaa cgt gct gat cct gca	768
	Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala	
	245 250 255	
	ttt gta tgc aga caa gga gtt gta gac aga ggt tgg gga aat ggt tgt	816
	Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys	
15	260 265 270	
	ggt ctc ttt ggc aaa ggc agc att gac act tgt gca aag ttt gct tgc	864
	Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys	
	275 280 285	
	agc acc aaa gca att ggt cga acc ata ttg aaa gag aac att aag tat	912
20	Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr	
	290 295 300	
	gaa gtt gcc atc ttt gtt cat ggt cca aca act gtg gaa tct cat ggc	960
	Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly	
	305 310 315 320	
25	aat tac cca aca caa gtt ggt gcc acc caa gct ggg agg ttt tca atc	1008
	Asn Tyr Pro Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile	
	325 330 335	
	act cct gct gct cca agt tac act ctg aaa ttg ggt gaa tat ggt gaa	1056
	Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu	
30	340 345 350	
	gta aca gtt gat tgt gaa cct agg tct ggc att gac acc aat gct tac	1104
	Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr	

	355	360	365	
	tat gta atg act gtg gga aca aag aca ttc tta gtt cac aga gaa tgg	1152		
	Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp			
	370	375	380	
5	ttc atg gat ttg aat ctc cct tgg agt tct gct gga agc act gtt tgg	1200		
	Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp			
	385	390	395	400
	agg aat cgt gaa aca ttg atg gag ttt gag gaa cca cat gca aca aaa	1248		
	Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys			
10	405	410	415	
	cag tca gta ata gca ttg ggc agt caa gag gga gca tta cat caa gcc	1296		
	Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala			
	420	425	430	
	ttg gct ggg gca att cct gtt gag ttt agt tcc aac act gtg aaa ctg	1344		
15	Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu			
	435	440	445	
	aca agt ggt cat ctg aaa tgc aga gta aag atg gag aag tta cag ttg	1392		
	Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu			
	450	455	460	
20	aaa gga acc act tat ggt gtt tgt tcc aaa gcc ttc aag ttt ctt gga	1440		
	Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly			
	465	470	475	480
	act cct gct gac act ggt cat ggg act gtg gtt ttg gaa ttg cag tac	1488		
	Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr			
25	485	490	495	
	act ggc act gat ggt cca tgc aag gtt ccc ata agc agt gtt gct tca	1536		
	Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser			
	500	505	510	
	ctc aat gat ctc act cca gta ggc aga ctt gtg aca gtc aac ccc ttt	1584		
30	Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe			
	515	520	525	
	gtt tct gtt gca act gcc aat gca aag gtg ctc ata gaa ttg gag cct	1632		

Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro
 530 535 540
 cca ttt ggt gat tct tac att gtt gta ggc aga gga gag caa cag atc 1680
 Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile
 5 545 550 555 560
 aac cat cac tgg cac aaa tct ggt tct tca att ggc aaa gcc ttc aca 1728
 Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr
 565 570 575
 acc act ctc aaa ggg gca cag aga ctt gct gct tta gga gac act gca 1776
 10 Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala
 580 585 590
 tgg gat ttc gga tct gtt gga ggt gtt ttc acc tct gtg gga aag gct 1824
 Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala
 595 600 605
 15 gtg cat caa gtt ttt ggt ggg gct ttt cga tcc ttg ttt ggt gga atg 1872
 Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met
 610 615 620
 tct tgg ata act caa ggt ctt tta ggg gct ctg ctt ttg tgg atg ggc 1920
 Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly
 20 625 630 635 640
 atc aat gca agg gac aga tca att gcc tta acc ttc ctt gca gtt gga 1968
 Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly
 645 650 655
 ggt gtt ctt ctc ttt ctc tct gta aat gtt cat gct 2004
 25 Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His Ala
 660 665
 <210> 5
 <211> 668
 <212> PRT
 30 <213> virus West Nile
 <400> 5
 Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala

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

	260	265	270
	Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys		
	275	280	285
	Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr		
5	290	295	300
	Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly		
	305	310	315 320
	Asn Tyr Pro Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile		
	325	330	335
10	Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu		
	340	345	350
	Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr		
	355	360	365
	Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp		
15	370	375	380
	Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp		
	385	390	395 400
	Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys		
	405	410	415
20	Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala		
	420	425	430
	Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu		
	435	440	445
	Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu		
25	450	455	460
	Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly		
	465	470	475 480
	Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr		
	485	490	495
30	Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser		
	500	505	510
	Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe		

	515	520	525	
	Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro			
	530	535	540	
	Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile			
5	545	550	555	560
	Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr			
	565	570	575	
	Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala			
	580	585	590	
10	Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala			
	595	600	605	
	Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met			
	610	615	620	
	Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly			
15	625	630	635	640
	Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly			
	645	650	655	
	Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His Ala			
	660	665		
20	<210>	6		
	<211>	1728		
	<212>	DNA		
	<213>	virus West Nile		
	<400>	6		
25	tccctgacag tgcaaactca tggagagtca actttggcca acaagaaagg cgcattgatg			60
	gattctacca aagcaacaag atatcttgctc aaaactgagt catggattct taggaatcct			120
	ggatatgctt tagttgcagc tgctattgga tggatgcttg ggtccaatac catgcagaga			180
	gttgtcttcg tagttctggt gttacttgta gctccagctt actcattcaa ctgtcttgga			240
	atgagcaata gggatttcct tgaagggtgt tccggtgcaa catggggtga tcttgtctta			300
30	gaaggagatt catgtgtgac aatcatgtcc aaagacaagc caaccattga tgtcaagatg			360
	atgaacatgg aagctgcaa tcttgcaaaa gttaggtctt actgctatct ggcaacagtg			420
	agtgatttgt caacaaaagc tgctgtctcc acaatgggag aggcacacaa tgacaaacot			480

		gctgatcctg catttgtatg cagacaagga gttgtagaca gaggttgggg aaatggttgt	540
		ggctctctttg gcaaaggcag cattgacact tgtgcaaagt ttgcttgacag caccaaagca	600
		attggtcgaa ccatattgaa agagaacatt aagtatgaag ttgccatctt tgttcattgt	660
		ccaacaactg tggaatctca tggcaattac agcacacaag ttggtgccac ccaagctggg	720
5		aggttttcaa tcaactcctgc tgctccaagt tacactctga aattgggtga atatggtgaa	780
		gtaacagttg attgtgaacc taggtctggc attgacacca atgcttacta tgtaatgact	840
		gtgggaacaa agacattctt agttcacaga gaatgggttca tggatttgaa tctcccttgg	900
		agttctgctg gaagcactgt ttggaggaat cgtgaaacat tgatggagtt tgaggaacca	960
		catgcaacaa aacagtcagt aatagcattg ggcagtcaag agggagcatt acatcaagcc	1020
10		ttggctgggg caattcctgt tgagtttagt tccaacactg tgaaactgac aagtggctcat	1080
		ctgaaatgca gagtaaagat ggagaagtta cagttgaaag gaaccactta tgggtgtttgt	1140
		tccaaagcct tcaagtttct tggaaactcct gctgacactg gtcattgggac tgtggttttg	1200
		gaattgcagt acactggcac tgatgggtcca tgcaagggtc ccataagcag tgttgcttca	1260
		ctcaatgatc tcaactccagt aggcagactt gtgacagtca acccctttgt ttctgttgca	1320
15		actgccaatg caaagggtgct catagaattg gagcctccat ttggtgattc ttacattgtt	1380
		gtaggcagag gagagcaaca gatcaaccat cactggcaca aatctgggtc ttcaattggc	1440
		aaagccttca caaccactct caaaggggca cagagacttg ctgctttagg agacactgca	1500
		tgggattttcg gatctgttgg aggtgttttc acctctgtgg gaaaggctgt gcatcaagtt	1560
		tttgggtggg cttttcgatc cttgtttggg ggaatgtctt ggataactca aggtctttta	1620
20		ggggctctgc ttttgtggat gggcatcaat gcaagggaca gatcaattgc cttaaccttc	1680
		cttgacagttg gaggtgttct tctctttctc tctgtaaagt ttcattgt	1728
	<210>	7	
	<211>	1728	
	<212>	DNA	
25	<213>	virus West Nile	
	<400>	7	
		agcttaactg tccagacaca cggatgaatcc acacttgcta acaagaaagg tgcttgatg	60
		gacagcacta aagcaactag atacttgggtc aagacagaat cttggatctt acgtaatcct	120
		ggttacgcac ttgtagccgc agtcataggt tggatgttgg gcagtaacac tatgcaacgt	180
30		gtagtgtttg ttgtacttct tctcttgggt gcacctgcat attccttcaa ttgcttggg	240
		atgtccaaca gagatttcct ggaaggagta agtggagcaa cttgggtcga tttggttctt	300
		gagggtgatt cttgtgtcac cattatgagt aaagacaaac ccacaataga tgtgaaaatg	360

	atgaatatgg aggccgctaa cttggcagaa gtccgtagct attgttactt agctactggt	420
	tcagaccctt ctactaaagc cgcttgccca actatgggtg aagcacacaa tgataagagg	480
	gcagaccctg cttttgtttg tcgtcaaggt gtagttgata ggggatgggg aaatggctgt	540
	ggactgtttg ggaagggttc tatagatact tgcgctaagt tcgcatgttc aacaaaagct	600
5	ataggacgaa caattctcaa ggaaaacatc aagtatgagg tcgcaatctt cgtacatgga	660
	cccactacag tcgaaagcca cgggaactat tccactcaag taggagcaac acaagctgga	720
	agattcagca ttacaccagc cgctccttca tacacattga aacttgggtga gtacgggtgag	780
	gtcactgttg attgcgagcc aagaagtgga atagatacaa atgcctatta cgttatgaca	840
	gttggcacta agacttttct tgttcatagg gagtgggttca tggacttgaa tctgccctgg	900
10	tccagtgtg gctctacagt ttggagaaac agagaaactc tcatggaatt tgaagagcct	960
	catgctacta agcaatcagt tattgtctct gggtcccaag aagggtgctct ccatcaggct	1020
	ttagctggtg ctattccagt tgagttttcc agcaatactg ttaagttgac ttctggccat	1080
	ttgaagtgtg ggggtgaagat ggagaaactc caacttaaag ggacaaccta tggagtttgc	1140
	tctaaggctt tcaagttctt gggcacacca gcagataccg gacatggaac agttgtactt	1200
15	gaacttcagt atactgggac cgatggacct tgtaaagtgc caatttcttc agttgcctct	1260
	ctcaatgact taactcctgt tgggagggtta gttaccgtga atccatttgt gagtgtagct	1320
	accgcaaagt ctaaagttct cattgagctt gaaccacctt ttggcgattc ctacatagtg	1380
	gttggaaagg gtgaacagca aatcaatcac cattggcata agagtggctc ttcaatcgga	1440
	aaggccttta ccacaacct gaaagggtgct caacgtttag ccgcactcgg tgataccgct	1500
20	tgggactttg gttcagtggg tggtgtgttt acatcagttg gcaaagcagt gcatcaggtg	1560
	tttggaggag cttttagaag tcttttcgga gggatgtcat ggattacca aggtttgctt	1620
	ggagccttgt tactttggat ggggatcaac gctagagatc gatctattgc actgactttt	1680
	ctggctgtgg gtggcgtgtt gctgttctta tcagtgaatg tacacgct	1728
	<210> 8	
25	<211> 2106	
	<212> DNA	
	<213> virus West Nile	
	<220>	
	<221> CDS	
30	<222> (1) .. (2082)	
	<400> 8	
	atg gct aag atg gtc att gtg ctt gtt gtg tgc ttg gct ctc tct gct	48

	Met	Ala	Lys	Met	Val	Ile	Val	Leu	Val	Val	Cys	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	
	1			5						10					15		
	gcc tca gct tct gcc tct gtg act ctg agc aac ttt caa gga aag gtc																96
	Ala Ser Ala Ser Ala Ser Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val																
5				20						25					30		
	atg atg act gtc aat gca act gat gtc act gat gtg ata aca atc cca																144
	Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro																
				35						40					45		
	aca gca gct ggg aag aat ctt tgc att gtc aga gct atg gat gtg ggc																192
10	Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly																
				50						55					60		
	tac atg tgt gat gac aca atc act tat gag tgt cca gta ctt tct gct																240
	Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala																
				65						70					75		
15	gga aat gat cct gaa gac att gat tgt tgg tgc acc aaa tca gct gtc																288
	Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val																
										85					90		
	tat gtt cgt tat ggg agg tgc aca aag acc aga cac tca cga aga agt																336
	Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser																
20				100						105					110		
	cga agg tcc ctg aca gtg caa act cat gga gag tca act ttg gcc aac																384
	Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn																
				115						120					125		
	aag aaa ggc gca tgg atg gat tct acc aaa gca aca aga tat ctt gtc																432
25	Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val																
				130						135					140		
	aaa act gag tca tgg att ctt agg aat cct gga tat gct tta gtt gca																480
	Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala																
				145						150					155		
30	gct gtc att gga tgg atg ctt ggg tcc aat acc atg cag aga gtt gtc																528
	Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val																
										165					170		
																	175

	ttc gta gtt ctg ttg tta ctt gta gct cca gct tac tca ttc aac tgt	576
	Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys	
	180 185 190	
	ctt gga atg agc aat agg gat ttc ctt gaa ggt gtt tcc ggt gca aca	624
5	Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr	
	195 200 205	
	tgg gtt gat ctt gtc tta gaa gga gat tca tgt gtg aca atc atg tcc	672
	Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser	
	210 215 220	
10	aaa gac aag cca acc att gat gtc aag atg atg aac atg gaa gct gcc	720
	Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala	
	225 230 235 240	
	aat ctt gca gaa gtt agg tct tac tgc tat ctg gca aca gtg agt gat	768
	Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp	
15	245 250 255	
	ttg tca aca aaa gct gcc tgt ccc aca atg gga gag gct cac aat gac	816
	Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp	
	260 265 270	
	aaa cgt gct gat cct gca ttt gta tgc aga caa gga gtt gta gac aga	864
20	Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg	
	275 280 285	
	ggg tgg gga aat ggt tgt ggt ctc ttt ggc aaa ggc agc att gac act	912
	Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr	
	290 295 300	
25	tgt gca aag ttt gct tgc agc acc aaa gca att ggt cga acc ata ttg	960
	Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu	
	305 310 315 320	
	aaa gag aac att aag tat gaa gtt gcc atc ttt gtt cat ggt cca aca	1008
	Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr	
30	325 330 335	
	act gtg gaa tct cat ggc aat tac agc aca caa gtt ggt gcc acc caa	1056
	Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln	

	340	345	350	
	gct ggg agg ttt tca atc act cct gct gct cca agt tac act ctg aaa	1104		
	Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys			
	355	360	365	
5	ttg ggt gaa tat ggt gaa gta aca gtt gat tgt gaa cct agg tct ggc	1152		
	Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly			
	370	375	380	
	att gac acc aat gct tac tat gta atg act gtg gga aca aag aca ttc	1200		
	Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe			
10	385	390	395	400
	tta gtt cac aga gaa tgg ttc atg gat ttg aat ctc cct tgg agt tct	1248		
	Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser			
	405	410	415	
	gct gga agc act gtt tgg agg aat cgt gaa aca ttg atg gag ttt gag	1296		
15	Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu			
	420	425	430	
	gaa cca cat gca aca aaa cag tca gta ata gca ttg ggc agt caa gag	1344		
	Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu			
	435	440	445	
20	gga gca tta cat caa gcc ttg gct ggg gca att cct gtt gag ttt agt	1392		
	Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser			
	450	455	460	
	tcc aac act gtg aaa ctg aca agt ggt cat ctg aaa tgc aga gta aag	1440		
	Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys			
25	465	470	475	480
	atg gag aag tta cag ttg aaa gga acc act tat ggt gtt tgt tcc aaa	1488		
	Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys			
	485	490	495	
	gcc ttc aag ttt ctt gga act cct gct gac act ggt cat ggg act gtg	1536		
30	Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val			
	500	505	510	
	gtt ttg gaa ttg caq tac act ggc act gat ggt cca tgc aaq gtt ccc	1584		

	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Thr	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	
	515				520				525								
	ata	agc	agt	gtt	gct	tca	ctc	aat	gat	ctc	act	cca	gta	ggc	aga	ctt	1632
	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	
5	530				535				540								
	gtg	aca	gtc	aac	ccc	ttt	gtt	tct	gtt	gca	act	gcc	aat	gca	aag	gtg	1680
	Val	Thr	Val	Asn	Pro	Phe	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Ala	Asn	Ala	Lys	Val	
	545				550				555				560				
	ctc	ata	gaa	ttg	gag	cct	cca	ttt	ggg	gat	tct	tac	att	gtt	gta	ggc	1728
10	Leu	Ile	Glu	Leu	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Val	Gly	
	565				570				575								
	aga	gga	gag	caa	cag	atc	aac	cat	cac	tgg	cac	aaa	tct	ggg	tct	tca	1776
	Arg	Gly	Glu	Gln	Gln	Ile	Asn	His	His	Trp	His	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	
	580				585				590								
15	att	ggc	aaa	gcc	ttc	aca	acc	act	ctc	aaa	ggg	gca	cag	aga	ctt	gct	1824
	Ile	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr	Thr	Thr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln	Arg	Leu	Ala	
	595				600				605								
	gct	tta	gga	gac	act	gca	tgg	gat	ttc	gga	tct	gtt	gga	ggg	gtt	ttc	1872
	Ala	Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Val	Phe	
20	610				615				620								
	acc	tct	gtg	gga	aag	gct	gtg	cat	caa	gtt	ttt	ggg	ggg	gct	ttt	cga	1920
	Thr	Ser	Val	Gly	Lys	Ala	Val	His	Gln	Val	Phe	Gly	Gly	Ala	Phe	Arg	
	625				630				635				640				
	tcc	ttg	ttt	ggg	gga	atg	tct	tgg	ata	act	caa	ggg	ctt	tta	ggg	gct	1968
25	Ser	Leu	Phe	Gly	Gly	Met	Ser	Trp	Ile	Thr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	
	645				650				655								
	ctg	ctt	ttg	tgg	atg	ggc	atc	aat	gca	agg	gac	aga	tca	att	gcc	tta	2016
	Leu	Leu	Leu	Trp	Met	Gly	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Arg	Ser	Ile	Ala	Leu	
	660				665				670								
30	acc	ttc	ctt	gca	gtt	gga	ggg	gtt	ctt	ctc	ttt	ctc	tct	gta	aat	gtt	2064
	Thr	Phe	Leu	Ala	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Phe	Leu	Ser	Val	Asn	Val	
	675				680				685								

cat gct aag gat gaa ctg tgagtagtta gcttaatcac ctag 2106

His Ala Lys Asp Glu Leu

690

<210> 9

5 <211> 694

<212> PRT

<213> virus West Nile

<400> 9

Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala

10 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ser Ala Ser Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val

20 25 30

Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro

35 40 45

15 Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly

50 55 60

Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala

65 70 75 80

Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val

20 85 90 95

Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser

100 105 110

Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn

115 120 125

25 Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val

130 135 140

Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala

145 150 155 160

Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val

30 165 170 175

Phe Val Val Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys

180 185 190

Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr
 195 200 205
 Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser
 210 215 220
 5 Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp
 245 250 255
 Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp
 10 260 265 270
 Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg
 275 280 285
 Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr
 290 295 300
 15 Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr
 325 330 335
 Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln
 20 340 345 350
 Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys
 355 360 365
 Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly
 370 375 380
 25 Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe
 385 390 395 400
 Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser
 405 410 415
 Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu
 30 420 425 430
 Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu
 435 440 445

Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser
 450 455 460
 Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys
 465 470 475 480
 5 Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys
 485 490 495
 Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val
 500 505 510
 Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro
 10 515 520 525
 Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu
 530 535 540
 Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val
 545 550 555 560
 15 Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly
 565 570 575
 Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser
 580 585 590
 Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala
 20 595 600 605
 Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe
 610 615 620
 Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg
 625 630 635 640
 25 Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala
 645 650 655
 Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu
 660 665 670
 Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val
 30 675 680 685
 His Ala Lys Asp Glu Leu
 690

```

<210>      10
<211>      2106
<212>      DNA
<213>      virus West Nile
5  <220>
    <221>      CDS
    <222>      (1)..(2082)
    <400>      10
    atg gct aag atg gtc att gtg ctt gtt gtg tgc ttg gct ctc tct gct      48
10  Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala
    1              5              10              15
    gcc tca gct tct gcc tct gtg act ctg agc aac ttt caa gga aag gtc      96
    Ala Ser Ala Ser Ala Ser Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val
    20              25              30
15  atg atg act gtc aat gca act gat gtc act gat gtg ata aca atc cca      144
    Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro
    35              40              45
    aca gca gct ggg aag aat ctt tgc att gtc aga gct atg gat gtg ggc      192
    Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly
20  50              55              60
    tac atg tgt gat gac aca atc act tat gag tgt cca gta ctt tct gct      240
    Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala
    65              70              75              80
    gga aat gat cct gaa gac att gat tgt tgg tgc acc aaa tca gct gtc      288
25  Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val
    85              90              95
    tat gtt cgt tat ggg agg tgc aca aag acc aga cac tca cga aga agt      336
    Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser
    100             105             110
30  cga agg tcc ctg aca gtg caa act cat gga gag tca act ttg gcc aac      384
    Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn
    115             120             125

```

	aag aaa ggc gca tgg atg gat tct acc aaa gca aca aga tat ctt gtc	432
	Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val	
	130 135 140	
	aaa act gag tca tgg att ctt agg aat cct gga tat gct tta gtt gca	480
5	Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala	
	145 150 155 160	
	gct gtc att gga tgg atg ctt ggg tcc aat acc atg cag aga gtt gtc	528
	Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val	
	165 170 175	
10	ttc gta gtt ctg ttg tta ctt gta gct cca gct tac tca ttc aac tgt	576
	Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys	
	180 185 190	
	ctt gga atg agc aat agg gat ttc ctt gaa ggt gtt tcc ggt gca aca	624
	Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr	
15	195 200 205	
	tgg gtt gat ctt gtc tta gaa gga gat tca tgt gtg aca atc atg tcc	672
	Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser	
	210 215 220	
	aaa gac aag cca acc att gat gtc aag atg atg aac atg gaa gct gcc	720
20	Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala	
	225 230 235 240	
	aat ctt gca gaa gtt agg tct tac tgc tat ctg gca aca gtg agt gat	768
	Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp	
	245 250 255	
25	ttg tca aca aaa gct gcc tgt ccc aca atg gga gag gct cac aat gac	816
	Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp	
	260 265 270	
	aaa cgt gct gat cct gca ttt gta tgc aga caa gga gtt gta gac aga	864
	Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg	
30	275 280 285	
	ggg tgg gga aat ggt tgt ggt ctc ttt ggc aaa ggc agc att gac act	912
	Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr	

	290	295	300	
	tgt gca aag ttt gct tgc agc acc aaa gca att ggt cga acc ata ttg			960
	Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu			
	305	310	315	320
5	aaa gag aac att aag tat gaa gtt gcc atc ttt gtt cat ggt cca aca			1008
	Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr			
	325	330	335	
	act gtg gaa tct cat ggc aat tac cca aca caa gtt ggt gcc acc caa			1056
	Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Pro Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln			
10	340	345	350	
	gct ggg agg ttt tca atc act cct gct gct cca agt tac act ctg aaa			1104
	Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys			
	355	360	365	
	ttg ggt gaa tat ggt gaa gta aca gtt gat tgt gaa cct agg tct ggc			1152
15	Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly			
	370	375	380	
	att gac acc aat gct tac tat gta atg act gtg gga aca aag aca ttc			1200
	Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe			
	385	390	395	400
20	tta gtt cac aga gaa tgg ttc atg gat ttg aat ctc cct tgg agt tct			1248
	Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser			
	405	410	415	
	gct gga agc act gtt tgg agg aat cgt gaa aca ttg atg gag ttt gag			1296
	Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu			
25	420	425	430	
	gaa cca cat gca aca aaa cag tca gta ata gca ttg ggc agt caa gag			1344
	Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu			
	435	440	445	
	gga gca tta cat caa gcc ttg gct ggg gca att cct gtt gag ttt agt			1392
30	Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser			
	450	455	460	
	tcc aac act gtg aaa ctg aca agt ggt cat ctg aaa tgc aga gta aag			1440

	Ser	Asn	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Val	Lys	
	465					470					475					480	
	atg	gag	aag	tta	cag	ttg	aaa	gga	acc	act	tat	ggt	gtt	tgt	tcc	aaa	1488
	Met	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Gly	Val	Cys	Ser	Lys	
5						485					490					495	
	gcc	ttc	aag	ttt	ctt	gga	act	cct	gct	gac	act	ggt	cat	ggg	act	gtg	1536
	Ala	Phe	Lys	Phe	Leu	Gly	Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Thr	Val	
						500					505					510	
	gtt	ttg	gaa	ttg	cag	tac	act	ggc	act	gat	ggt	cca	tgc	aag	gtt	ccc	1584
10	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Thr	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	
						515					520					525	
	ata	agc	agt	gtt	gct	tca	ctc	aat	gat	ctc	act	cca	gta	ggc	aga	ctt	1632
	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	
						530					535					540	
15	gtg	aca	gtc	aac	ccc	ttt	gtt	tct	gtt	gca	act	gcc	aat	gca	aag	gtg	1680
	Val	Thr	Val	Asn	Pro	Phe	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Ala	Asn	Ala	Lys	Val	
						545										560	
	ctc	ata	gaa	ttg	gag	cct	cca	ttt	ggt	gat	tct	tac	att	gtt	gta	ggc	1728
	Leu	Ile	Glu	Leu	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Val	Gly	
20						565					570					575	
	aga	gga	gag	caa	cag	atc	aac	cat	cac	tgg	cac	aaa	tct	ggt	tct	tca	1776
	Arg	Gly	Glu	Gln	Gln	Ile	Asn	His	His	Trp	His	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	
						580					585					590	
	att	ggc	aaa	gcc	ttc	aca	acc	act	ctc	aaa	ggg	gca	cag	aga	ctt	gct	1824
25	Ile	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr	Thr	Thr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln	Arg	Leu	Ala	
						595					600					605	
	gct	tta	gga	gac	act	gca	tgg	gat	ttc	gga	tct	gtt	gga	ggt	gtt	ttc	1872
	Ala	Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Val	Phe	
						610					615					620	
30	acc	tct	gtg	gga	aag	gct	gtg	cat	caa	gtt	ttt	ggt	ggg	gct	ttt	cga	1920
	Thr	Ser	Val	Gly	Lys	Ala	Val	His	Gln	Val	Phe	Gly	Gly	Ala	Phe	Arg	
						625					630					640	

tcc ttg ttt ggt gga atg tct tgg ata act caa ggt ctt tta ggg gct 1968
 Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala
 645 650 655
 ctg ctt ttg tgg atg ggc atc aat gca agg gac aga tca att gcc tta 2016
 5 Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu
 660 665 670
 acc ttc ctt gca gtt gga ggt gtt ctt ctc ttt ctc tct gta aat gtt 2064
 Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val
 675 680 685
 10 cat gct aag gat gaa ctg tgagtagtta gcttaatcac ctag 2106
 His Ala Lys Asp Glu Leu
 690
 <210> 11
 <211> 694
 15 <212> PRT
 <213> virus West Nile
 <400> 11
 Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 20 Ala Ser Ala Ser Ala Ser Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val
 20 25 30
 Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro
 35 40 45
 Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly
 25 50 55 60
 Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val
 85 90 95
 30 Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser
 100 105 110
 Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn

	115	120	125	
	Lys	Lys	Gly	Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val
	130	135	140	
	Lys	Thr	Glu	Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala
5	145	150	155	160
	Ala	Val	Ile	Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val
	165	170	175	
	Phe	Val	Val	Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys
	180	185	190	
10	Leu	Gly	Met	Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr
	195	200	205	
	Trp	Val	Asp	Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser
	210	215	220	
	Lys	Asp	Lys	Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala
15	225	230	235	240
	Asn	Leu	Ala	Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp
	245	250	255	
	Leu	Ser	Thr	Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp
	260	265	270	
20	Lys	Arg	Ala	Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg
	275	280	285	
	Gly	Trp	Gly	Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr
	290	295	300	
	Cys	Ala	Lys	Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu
25	305	310	315	320
	Lys	Glu	Asn	Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly Pro Thr
	325	330	335	
	Thr	Val	Glu	Ser His Gly Asn Tyr Pro Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln
	340	345	350	
30	Ala	Gly	Arg	Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys
	355	360	365	
	Leu	Gly	Glu	Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly

	370		375		380	
	Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr Phe					
	385		390		395	400
	Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp Ser Ser					
5		405		410		415
	Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu Phe Glu					
		420		425		430
	Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser Gln Glu					
		435		440		445
10	Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu Phe Ser					
		450		455		460
	Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Val Lys					
		465		470		480
	Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys					
15		485		490		495
	Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val					
		500		505		510
	Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro					
		515		520		525
20	Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu					
		530		535		540
	Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val					
		545		550		560
	Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly					
25		565		570		575
	Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser					
		580		585		590
	Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala					
		595		600		605
30	Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe					
		610		615		620
	Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg					


```

625              630              635              640
Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala
              645              650              655
Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu
5              660              665              670
Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val
              675              680              685
His Ala Lys Asp Glu Leu
              690
10 <210>          12
    <211>          1830
    <212>          DNA
    <213>          virus West Nile
    <220>
15 <221>          CDS
    <222>          (1)..(1806)
    <400>          12
atg gct aag atg gtc att gtg ctt gtt gtg tgc ttg gct ctc tct gct      48
Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala
20 1              5              10              15
gcc tca gct tct gcc tct tcc ctg aca gtg caa act cat gga gag tca      96
Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser
              20              25              30
act ttg gcc aac aag aaa ggc gca tgg atg gat tct acc aaa gca aca      144
25 Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr
              35              40              45
aga tat ctt gtc aaa act gag tca tgg att ctt agg aat cct gga tat      192
Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr
              50              55              60
30 gct tta gtt gca gct gtc att gga tgg atg ctt ggg tcc aat acc atg      240
Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met
              65              70              75              80

```

	cag aga gtt gtc ttc gta gtt ctg ttg tta ctt gta gct cca gct tac	288
	Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr	
	85 90 95	
	tca ttc aac tgt ctt gga atg agc aat agg gat ttc ctt gaa ggt gtt	336
5	Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val	
	100 105 110	
	tcc ggt gca aca tgg gtt gat ctt gtc tta gaa gga gat tca tgt gtg	384
	Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val	
	115 120 125	
10	aca atc atg tcc aaa gac aag cca acc att gat gtc aag atg atg aac	432
	Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn	
	130 135 140	
	atg gaa gct gcc aat ctt gca gaa gtt agg tct tac tgc tat ctg gca	480
	Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala	
15	145 150 155 160	
	aca gtg agt gat ttg tca aca aaa gct gcc tgt ccc aca atg gga gag	528
	Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu	
	165 170 175	
	gct cac aat gac aaa cgt gct gat cct gca ttt gta tgc aga caa gga	576
20	Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly	
	180 185 190	
	gtt gta gac aga ggt tgg gga aat ggt tgt ggt ctc ttt ggc aaa ggc	624
	Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly	
	195 200 205	
25	agc att gac act tgt gca aag ttt gct tgc agc acc aaa gca att ggt	672
	Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly	
	210 215 220	
	cga acc ata ttg aaa gag aac att aag tat gaa gtt gcc atc ttt gtt	720
	Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val	
30	225 230 235 240	
	cat ggt cca aca act gtg gaa tct cat ggc aat tac agc aca caa gtt	768
	His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val	

		245		250		255		
		ggt gcc acc caa gct ggg agg ttt tca atc act cct gct gct cca agt						816
		Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser						
		260		265		270		
5		tac act ctg aaa ttg ggt gaa tat ggt gaa gta aca gtt gat tgt gaa						864
		Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu						
		275		280		285		
		cct agg tct ggc att gac acc aat gct tac tat gta atg act gtg gga						912
		Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly						
10		290		295		300		
		aca aag aca ttc tta gtt cac aga gaa tgg ttc atg gat ttg aat ctc						960
		Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu						
		305		310		315		320
		cct tgg agt tct gct gga agc act gtt tgg agg aat cgt gaa aca ttg						1008
15		Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu						
		325		330		335		
		atg gag ttt gag gaa cca cat gca aca aaa cag tca gta ata gca ttg						1056
		Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu						
		340		345		350		
20		ggc agt caa gag gga gca tta cat caa gcc ttg gct ggg gca att cct						1104
		Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro						
		355		360		365		
		gtt gag ttt agt tcc aac act gtg aaa ctg aca agt ggt cat ctg aaa						1152
		Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys						
25		370		375		380		
		tgc aga gta aag atg gag aag tta cag ttg aaa gga acc act tat ggt						1200
		Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly						
		385		390		395		400
		gtt tgt tcc aaa gcc ttc aag ttt ctt gga act cct gct gac act ggt						1248
30		Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly						
		405		410		415		
		cat ggg act gtg gtt ttg gaa ttg cag tac act ggc act gat ggt cca						1296

	His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro	
	420 425 430	
	tgc aag gtt ccc ata agc agt gtt gct tca ctc aat gat ctc act cca	1344
	Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro	
5	435 440 445	
	gta ggc aga ctt gtg aca gtc aac ccc ttt gtt tct gtt gca act gcc	1392
	Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala	
	450 455 460	
	aat gca aag gtg ctc ata gaa ttg gag cct cca ttt ggt gat tct tac	1440
10	Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr	
	465 470 475 480	
	att gtt gta ggc aga gga gag caa cag atc aac cat cac tgg cac aaa	1488
	Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys	
	485 490 495	
15	tct ggt tct tca att ggc aaa gcc ttc aca acc act ctc aaa ggg gca	1536
	Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala	
	500 505 510	
	cag aga ctt gct gct tta gga gac act gca tgg gat ttc gga tct gtt	1584
	Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val	
20	515 520 525	
	gga ggt gtt ttc acc tct gtg gga aag gct gtg cat caa gtt ttt ggt	1632
	Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly	
	530 535 540	
	ggg gct ttt cga tcc ttg ttt ggt gga atg tct tgg ata act caa ggt	1680
25	Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly	
	545 550 555 560	
	ctt tta ggg gct ctg ctt ttg tgg atg ggc atc aat gca agg gac aga	1728
	Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg	
	565 570 575	
30	tca att gcc tta acc ttc ctt gca gtt gga ggt gtt ctt ctc ttt ctc	1776
	Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu	
	580 585 590	

tct gta aat gtt cat gct aag gat gaa ctg tgagtagtta gcttaatcac 1826
 Ser Val Asn Val His Ala Lys Asp Glu Leu
 595 600
 ctag 1830

5 <210> 13
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> virus West Nile
 <400> 13

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

20 Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr
 85 90 95
 Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val
 100 105 110
 Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val
 25 115 120 125
 Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn
 130 135 140
 Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala
 145 150 155 160

30 Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu
 165 170 175
 Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly

	180	185	190
	Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly		
	195	200	205
	Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly		
5	210	215	220
	Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val		
	225	230	235 240
	His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val		
	245	250	255
10	Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser		
	260	265	270
	Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu		
	275	280	285
	Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly		
15	290	295	300
	Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu		
	305	310	315 320
	Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu		
	325	330	335
20	Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu		
	340	345	350
	Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro		
	355	360	365
	Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys		
25	370	375	380
	Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly		
	385	390	395 400
	Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly		
	405	410	415
30	His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro		
	420	425	430
	Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro		

435 440 445
 Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala
 450 455 460
 Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr
5 465 470 475 480
 Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys
 485 490 495
 Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala
 500 505 510
10 Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val
 515 520 525
 Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly
 530 535 540
 Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly
15 545 550 555 560
 Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg
 565 570 575
 Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu
 580 585 590
20 Ser Val Asn Val His Ala Lys Asp Glu Leu
 595 600
 <210> 14
 <211> 1832
 <212> DNA
25 <213> virus West Nile
 <220>
 <221> CDS
 <222> (6)..(1808)
 <400> 14
30 aaaca atg gct aag atg gtc att gtt ctt gtt gtg tgt ttg gca ctc tct 50
 Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser
 1 5 10 15

	gct gca tca gct tct gcc agc tta act gtc cag aca cac ggt gaa tcc	98
	Ala Ala Ser Ala Ser Ala Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser	
	20 25 30	
	aca ctt gct aac aag aaa ggt gct tgg atg gac agc act aaa gca act	146
5	Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr	
	35 40 45	
	aga tac ttg gtc aag aca gaa tct tgg atc tta cgt aat cct ggt tac	194
	Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr	
	50 55 60	
10	gca ctt gta gcc gca gtc ata ggt tgg atg ttg ggc agt aac act atg	242
	Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met	
	65 70 75	
	caa cgt gta gtg ttt gtt gta ctt ctt ctc ttg gtt gca cct gca tat	290
	Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr	
15	80 85 90 95	
	tcc ttc aat tgc ttg ggg atg tcc aac aga gat ttc ctg gaa gga gta	338
	Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val	
	100 105 110	
	agt gga gca act tgg gtc gat ttg gtt ctt gag ggt gat tct tgt gtc	386
20	Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val	
	115 120 125	
	acc att atg agt aaa gac aaa ccc aca ata gat gtg aaa atg atg aat	434
	Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn	
	130 135 140	
25	atg gag gcc gct aac ttg gca gaa gtc cgt agc tat tgt tac tta gct	482
	Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala	
	145 150 155	
	act gtt tca gac ctt tct act aaa gcc gct tgc cca act atg ggt gaa	530
	Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu	
30	160 165 170 175	
	gca cac aat gat aag agg gca gac cct gct ttt gtt tgt cgt caa ggt	578
	Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly	

		180	185	190	
		gta gtt gat agg gga tgg gga aat ggc tgt gga ctg ttt ggg aag ggt			626
		Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly			
		195	200	205	
5		tct ata gat act tgc gct aag ttc gca tgt tca aca aaa gct ata gga			674
		Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly			
		210	215	220	
		cga aca att ctc aag gaa aac atc aag tat gag gtc gca atc ttc gta			722
		Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val			
10		225	230	235	
		cat gga ccc act aca gtc gaa agc cac ggg aac tat tcc act caa gta			770
		His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val			
		240	245	250	255
		gga gca aca caa gct gga aga ttc agc att aca cca gcc gct cct tca			818
15		Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser			
		260	265	270	
		tac aca ttg aaa ctt ggt gag tac ggt gag gtc act gtt gat tgc gag			866
		Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu			
		275	280	285	
20		cca aga agt gga ata gat aca aat gcc tat tac gtt atg aca gtt ggc			914
		Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly			
		290	295	300	
		act aag act ttt ctt gtt cat agg gag tgg ttc atg gac ttg aat ctg			962
		Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu			
25		305	310	315	
		ccc tgg tcc agt gct ggc tct aca gtt tgg aga aac aga gaa act ctc			1010
		Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu			
		320	325	330	335
		atg gaa ttt gaa gag cct cat gct act aag caa tca gtt att gct ctt			1058
30		Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu			
		340	345	350	
		ggg tcc caa gaa ggt gct ctc cat cag gct tta gct ggt gct att cca			1106

	Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro	
	355 360 365	
	ggt gag ttt tcc agc aat act gtt aag ttg act tct ggc cat ttg aag	1154
	Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys	
5	370 375 380	
	tgt agg gtg aag atg gag aaa ctc caa ctt aaa ggg aca acc tat gga	1202
	Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly	
	385 390 395	
	ggt tgc tct aag gct ttc aag ttc ttg ggc aca cca gca gat acc gga	1250
10	Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly	
	400 405 410 415	
	cat gga aca gtt gta ctt gaa ctt cag tat act ggg acc gat gga cct	1298
	His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro	
	420 425 430	
15	tgt aaa gtg cca att tct tca gtt gcc tct ctc aat gac tta act cct	1346
	Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro	
	435 440 445	
	ggt ggg agg tta gtt acc gtg aat cca ttt gtg agt gta gct acc gca	1394
	Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala	
20	450 455 460	
	aat gct aaa gtt ctc att gag ctt gaa cca cct ttt ggc gat tcc tac	1442
	Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr	
	465 470 475	
	ata gtg gtt gga agg ggt gaa cag caa atc aat cac cat tgg cat aag	1490
25	Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys	
	480 485 490 495	
	agt ggc tct tca atc gga aag gcc ttt acc aca acc ctg aaa ggt gct	1538
	Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala	
	500 505 510	
30	caa cgt tta gcc gca ctc ggt gat acc gct tgg gac ttt ggt tca gtg	1586
	Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val	
	515 520 525	

ggt ggt gtg ttt aca tca gtt ggc aaa gca gtg cat cag gtg ttt gga 1634
 Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly
 530 535 540
 gga gcc ttt aga agt ctt ttc gga ggg atg tca tgg att acc caa ggt 1682
 5 Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly
 545 550 555
 ttg ctt gga gcc ttg tta ctt tgg atg ggg atc aac gct aga gat cga 1730
 Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg
 560 565 570 575
 10 tct att gca ctg act ttt ctg gct gtg ggt ggc gtg ttg ctg ttc tta 1778
 Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu
 580 585 590
 tca gtg aat gta cac gct aag gat gaa ctg tgagtagtta gcttaatcac 1828
 Ser Val Asn Val His Ala Lys Asp Glu Leu
 15 595 600
 ctag 1832
 <210> 15
 <211> 601
 <212> PRT
 20 <213> virus West Nile
 <400> 15
 Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Ser Ala Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr
 25 20 25 30
 Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala
 50 55 60
 30 Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln
 65 70 75 80
 Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser

	85	90	95
	Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser		
	100	105	110
	Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr		
5	115	120	125
	Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met		
	130	135	140
	Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr		
	145	150	155
10	160		
	Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala		
	165	170	175
	His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val		
	180	185	190
	Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser		
15	195	200	205
	Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg		
	210	215	220
	Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His		
	225	230	235
20	240		
	Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly		
	245	250	255
	Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr		
	260	265	270
	Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro		
25	275	280	285
	Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr		
	290	295	300
	Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro		
	305	310	315
30	320		
	Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met		
	325	330	335
	Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly		

	340	345	350
	Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val		
	355	360	365
	Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys		
5	370	375	380
	Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val		
	385	390	395 400
	Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His		
	405	410	415
10	Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys		
	420	425	430
	Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val		
	435	440	445
	Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn		
15	450	455	460
	Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile		
	465	470	475 480
	Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser		
	485	490	495
20	Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln		
	500	505	510
	Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly		
	515	520	525
	Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly		
25	530	535	540
	Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu		
	545	550	555 560
	Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser		
	565	570	575
30	Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser		
	580	585	590

Val Asn Val His Ala Lys Asp Glu Leu

595

600

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de substâncias compreendendo:

- a) polipeptídeos isolados, purificados, e/ou recombinantes compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15;
- 5 b) um fragmento do polipeptídeo determinado na SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15 ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 que é "de Y a Z", em que Y é o aminoácido de N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido de C-terminal da sequência especificada conforme determinado em qualquer uma de Tabelas 9, 10, 11, ou 12, ou um fragmento de um
10 polipeptídeo conforme determinado nas Tabelas 15 ou 16;
- c) um peptídeo E conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um peptídeo E conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um
15 indivíduo;
- d) um polipeptídeo de acordo com a), b) ou c) que compreende adicionalmente uma sequência de polipeptídeo heteróloga;
- e) um polipeptídeo derivado de planta de acordo com a), b), c) ou d);
- 20 f) uma composição compreendendo um veículo e um polipeptídeo conforme determinado em qualquer um de a), b), c), d) ou e), em que o referido veículo compreendendo material celular do sistema de expressão em planta, mamífero ou bacteriano (opcionalmente suspenso em um tampão), um adjuvante ou um excipiente farmacologicamente aceitável;
- 25 g) uma sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou codificando um ou mais fragmentos de polipeptídeo de SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 conforme determinado em (b) ou (c), opcionalmente em que a referida sequência de polinucleotídeos tem um teor de G+C de no mínimo 40% e menos de
30 50% ou um teor de G+C conforme determinado na Tabela 13;
- h) uma sequência de polinucleotídeos que é no mínimo 70% (ou uma percentagem conforme especificado na Tabela 14) idêntica à SEQ ID

NO: 1, codifica um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 2 e tem um teor de G+C de entre cerca de 40% e cerca de 50% (ou um teor de G+C específico conforme especificado na Tabela 13);

5 i) uma sequência de polinucleotídeos de no mínimo 8 nucleotídeos consecutivos de uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (g) ou (h);

j) uma sequência de polinucleotídeos compreendendo SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, ou 14 ou um fragmento de no mínimo 8 nucleotídeos consecutivos de SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, ou 14;

10 k) um polinucleotídeo que é complementar aos polinucleotídeos determinados em (g), (h), (i), ou (j);

l) um polinucleotídeo que hibridiza sob baixa, intermediária ou elevada estringência com uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (g), (h), (i), (i) ou (k);

15 m) um constructo genético compreendendo uma sequência de polinucleotídeos conforme determinado em (g), (h), (i), (i) ou (k);

n) um vetor compreendendo um polinucleotídeo ou constructo genético conforme determinado em (g), (h), (i), (i), (j), (k) ou (l);

20 o) uma célula hospedeira compreendendo um vetor conforme determinado em (n), um constructo genético conforme determinado em (m), ou um polinucleotídeo conforme determinado em qualquer uma de (g), (h), (i), (j) ou (k);

25 p) uma planta transgênica, célula de planta, ou parte de planta compreendendo um vetor conforme determinado em (n), um constructo genético conforme determinado em (m) ou um polinucleotídeo conforme determinado em qualquer uma de (g), (h), (i), (j) ou (k); ou

q) uma sonda compreendendo um polinucleotídeo de acordo com (g), (h), (i), (j), (k) ou (l) e, opcionalmente, uma etiqueta ou marcador.

30 2. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 1, em que o referido polipeptídeo é produzido em uma célula de planta compreendendo:

a) transformar uma célula de planta com um vetor recombinante

compreendendo um polinucleotídeo codificando o referido polipeptídeo ou fragmento do mesmo para formar uma célula de planta transformada;

b) cultivar a referida célula de planta transformada sob condições adequadas para a expressão do referido polipeptídeo; e

5 c) recuperar o referido polipeptídeo da referida célula de planta transformada.

3. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 3, em que o referido polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo é fundido a uma sequência de polipeptídeo heteróloga.

10 4. Método para imunizar um indivíduo contra um vírus West Nile compreendendo administrar uma quantidade de uma composição suficiente para induzir uma reação imune no referido indivíduo, a referida composição compreendendo: um veículo e um polipeptídeo compreendendo: (i) SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; (ii) um E-peptídeo conforme determinado em qual-
15 quer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; (iii) um fragmento de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; ou (iv) um fragmento con-
20 forme determinado na Tabela 9, 10, 11, 12, 15, ou 16, em que o referido polipeptídeo ou fragmento induz uma reação imunoprotetora contra um vírus West Nile infeccioso ou uma reação de anticorpos que neutraliza vírus West Nile infeccioso.

25 5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o referido polipeptídeo ou o referido fragmento de polipeptídeo é fundido a uma sequência de polipeptídeo heteróloga.

6. Método de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que o referido polipeptídeo ou fragmento do mesmo é um polipeptídeo produzido por planta fragmento de polipeptídeo produzido por planta.

30 7. Método para induzir uma reação imune a cepas de vírus West Nile (WNV) compreendendo administrar: (A) uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo compreendendo: (i) SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13

ou 15; (ii) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; (iii) um fragmento de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; ou (iv) um fragmento conforme determinado na Tabela 9, 10, 11, 12, 15, ou 16, em que o referido polipeptídeo ou fragmento induz uma reação imunoprotetora contra um vírus West Nile infeccioso ou uma reação de anticorpos neutralizantes contra um vírus West Nile infeccioso; (B) um viral vetor que compreende uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo compreendendo: SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; (ii) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; (iii) um fragmento de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; ou (iv) um fragmento conforme determinado na Tabela 9, 10, 11, 12, 15, ou 16, em que o referido polipeptídeo ou fragmento induz uma reação imunoprotetora contra um vírus West Nile infeccioso ou uma reação de anticorpos neutralizantes contra um vírus West Nile infeccioso; ou (C) no mínimo um polipeptídeo compreendendo: SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; (ii) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; (iii) um fragmento de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; ou (iv) um fragmento conforme determinado na Tabela 9, 10, 11, 12, 15, ou 16, em que o referido polipeptídeo ou fragmento induz uma reação imunoprotetora contra um vírus West Nile infeccioso ou uma reação de anticorpos neutralizantes contra um vírus West Nile infeccioso para um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir uma reação imune no referido animal.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o referido método compreende adicionalmente reforçar a reação imune do referido animal por administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo: SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; (ii) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; (iii) um fragmento de no mínimo cinco aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; ou (iv) um fragmento conforme determinado na Tabela 9, 10, 11, 12, 15, ou 16, em que o referido polipeptídeo ou fragmento induz uma reação imunoprotetora contra um vírus West Nile infeccioso ou uma reação de anticorpos neutralizantes contra um vírus West Nile infeccioso.

9. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que o referido polipeptídeo ou fragmento do referido polipeptídeo é fundido a uma sequência de polipeptídeo heteróloga.

10. Método de acordo com a reivindicação 7, 8 ou 9, em que o referido polipeptídeo ou fragmento do referido polipeptídeo é de origem de planta ou obtido de uma planta transgênica ou parte de planta.

11. Método de acordo com a reivindicação 4, 5, 8 ou 9, em que o referido polipeptídeo é preparado em uma célula procariótica ou eucariótica.

12. Método para ligar um anticorpo a um polipeptídeo compreendendo contactar uma amostra contendo um anticorpo com um polipeptídeo compreendendo: a) polipeptídeos isolados, purificados, e/ou recombinantes compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; b) um fragmento do polipeptídeo determinado em SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15 ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 que é "de Y a Z", em que Y é o aminoácido de N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido de C-terminal da sequência especificada conforme determinado em qualquer uma das Tabelas 9, 10, 11, ou 12, um fragmento de um polipeptídeo conforme determinado na Tabela 15 ou 16; c) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de

um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; ou d) um polipeptídeo de acordo com qualquer um de a), b) ou c) que compreende adicionalmente uma sequência de polipeptídeo heteróloga sob condições que permitem a formação de um complexo de antígeno-anticorpo.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, compreendendo adicionalmente a etapa de detectar a formação do referido complexo de antígeno-anticorpo.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que o referido método é um imunoensaio.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o referido imunoensaio é selecionado entre o grupo consistindo em ensaios imunosorventes ligados a enzimas (ELISAs), radioimunoensaios (RIAs), ensaios de fluxo lateral, ensaios de fitas imunocromatográficas, ensaios de fluxo automatizado, *Western blots*, ensaios de imunoprecipitação, ensaios de ligação cromatográfica de fluxo reversível, ensaios de aglutinação, e biossensores.

16. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o referido método é realizado usando uma série de polipeptídeos compreendendo o mesmo polipeptídeo ou uma combinação de polipeptídeos compreendendo um polipeptídeo derivado de outros vírus e um ou mais polipeptídeos selecionados entre : a) polipeptídeos isolados, purificados, e/ou recombinantes compreendendo SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; b) um fragmento do polipeptídeo determinado em SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15 ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 que é "de Y a Z", em que Y é o aminoácido de N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido de C-terminal da sequência especificada conforme determinado em qualquer uma de Tabelas 9, 10, 11, ou 12, um fragmento de um polipeptídeo conforme determinado nas Tabelas 15 ou 16; c) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos neutralizantes quando administrado a um indivíduo; ou d) um poli-

peptídeo de acordo com qualquer um de a), b) ou c) que compreende adicionalmente uma sequência de polipeptídeo heteróloga.

17. Método para produzir polipeptídeo compreendendo:

a) transformar uma célula com um polinucleotídeo codificando
 5 no mínimo um polipeptídeo compreendendo: (i) SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15; (ii) um fragmento do polipeptídeo determinado em SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15 ou um fragmento de SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13 ou 15 que é "de Y a Z", em que Y é o aminoácido de N-terminal da sequência especificada e Z é o aminoácido de C-terminal da sequência especificada conforme determinado
 10 em qualquer uma de Tabelas 9, 10, 11, ou 12, um fragmento de um polipeptídeo conforme determinado nas Tabelas 15 ou 16; (iii) um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 ou um fragmento de um E-peptídeo conforme determinado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 9, 11, 13 ou 15 que produz uma reação de anticorpos
 15 neutralizantes quando administrado a um indivíduo; ou iv) um polipeptídeo de acordo com qualquer um de (i), (ii) ou (iii) que compreende adicionalmente uma sequência de polipeptídeo heteróloga;

b) cultivar a referida célula transformada sob condições que permitem a proliferação da referida célula de planta transformada e a acumulação do referido polipeptídeo; e
 20

c) recuperar ou purificar o referido no mínimo um polipeptídeo a partir da referida célula.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a célula é uma célula de planta transformada é selecionada entre o grupo consistindo
 25 em uma célula de planta inferior, uma célula de planta monocotiledônea, e uma célula de planta dicotiledônea; uma célula procariótica; ou uma linhagem celular de mamífero.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que a célula de planta transformada é uma linhagem de células de tabaco.

30 20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que a referida linhagem de células de tabaco é NT-1.

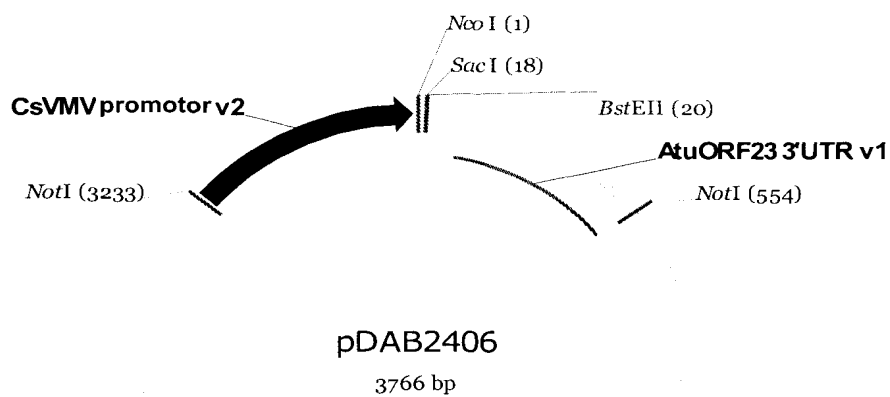


FIG. 1

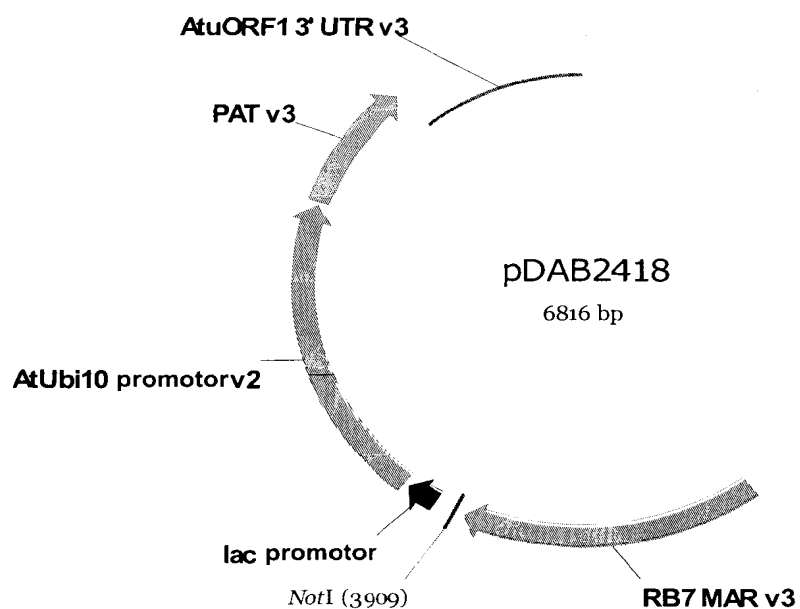
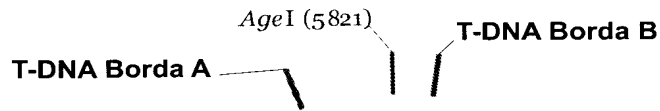


FIG. 2



pDAB2407
5828 bp

FIG. 3

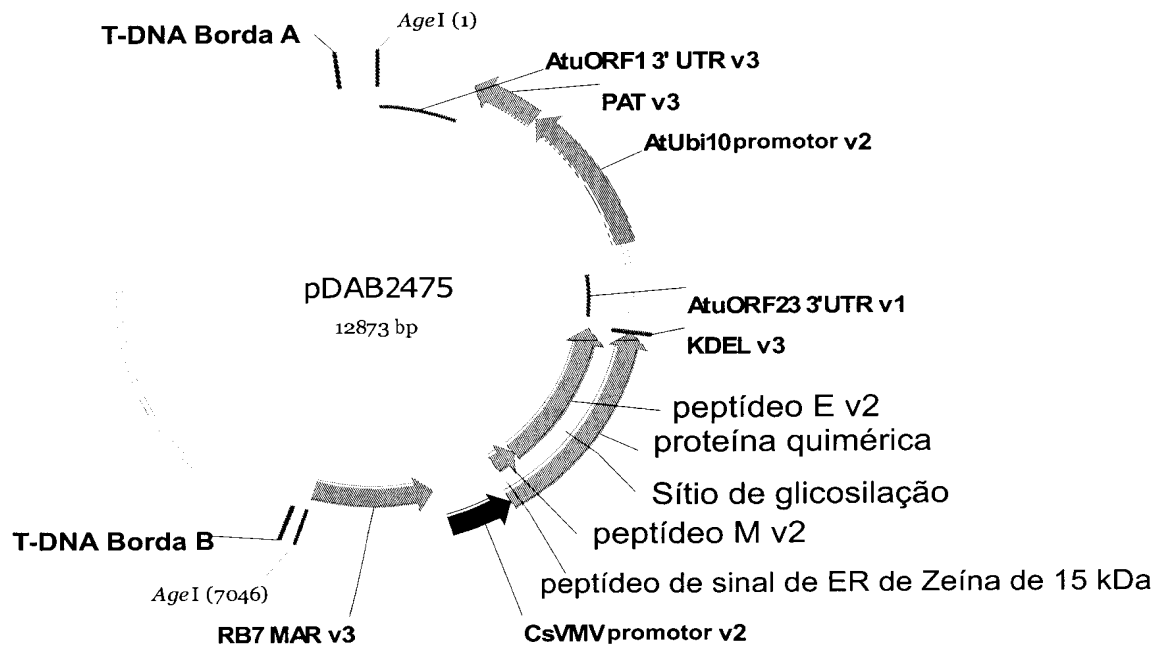


FIG. 4

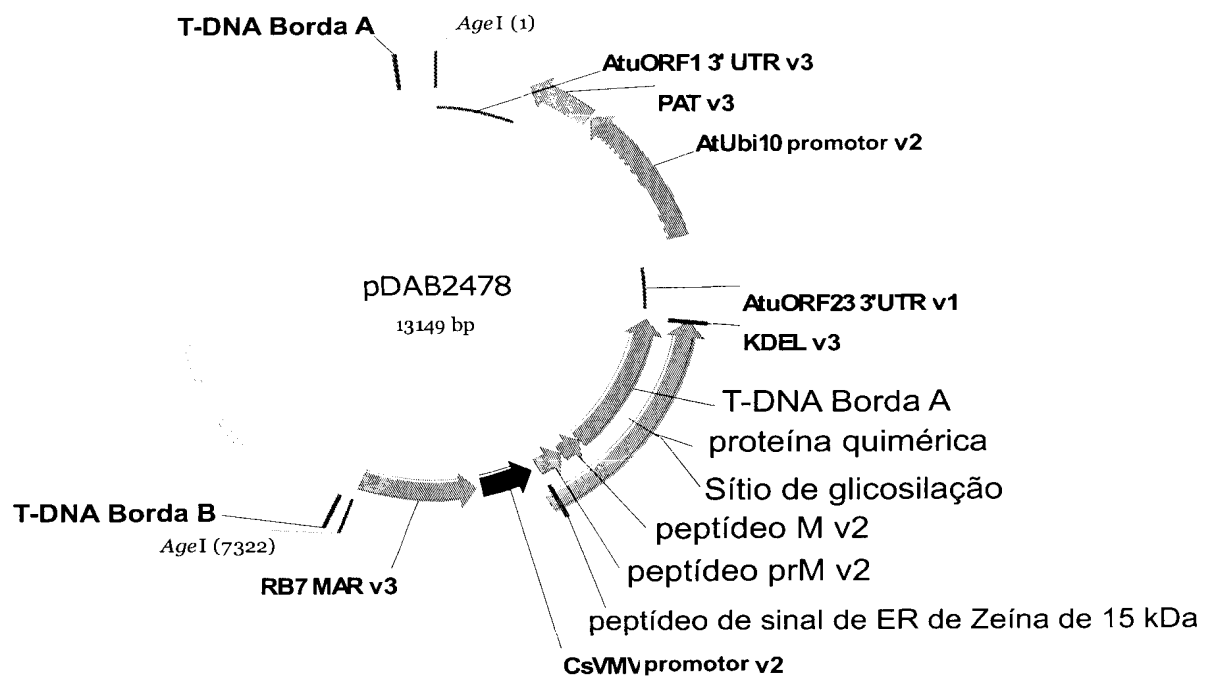


FIG. 5

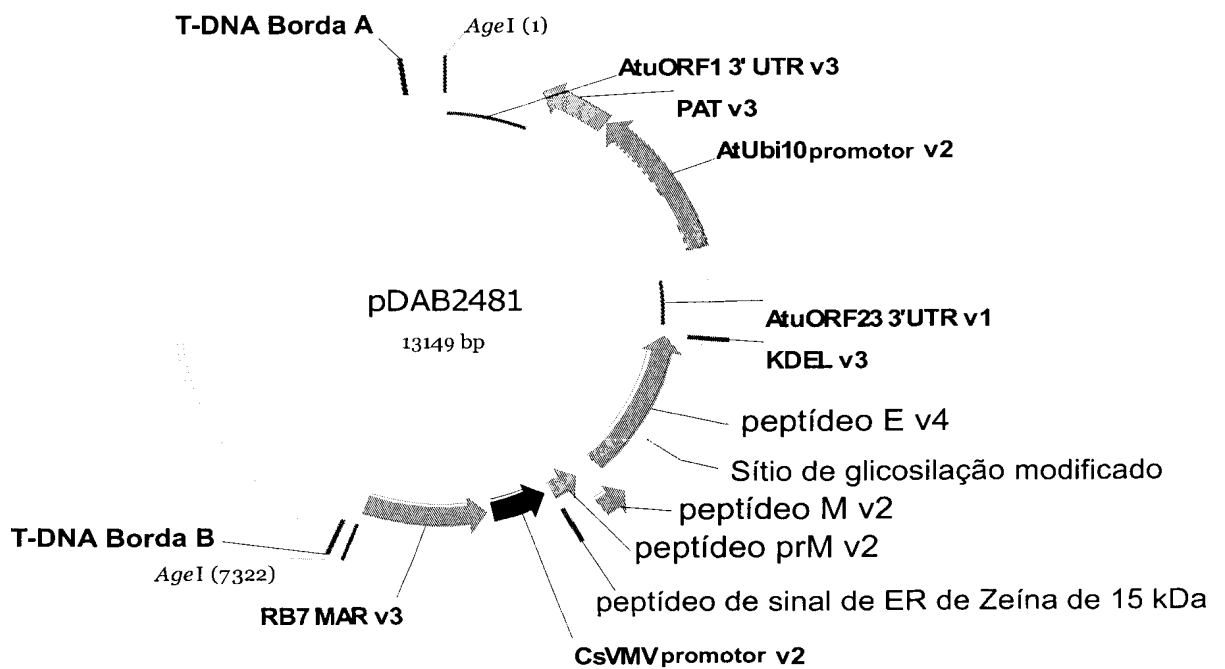


FIG. 6

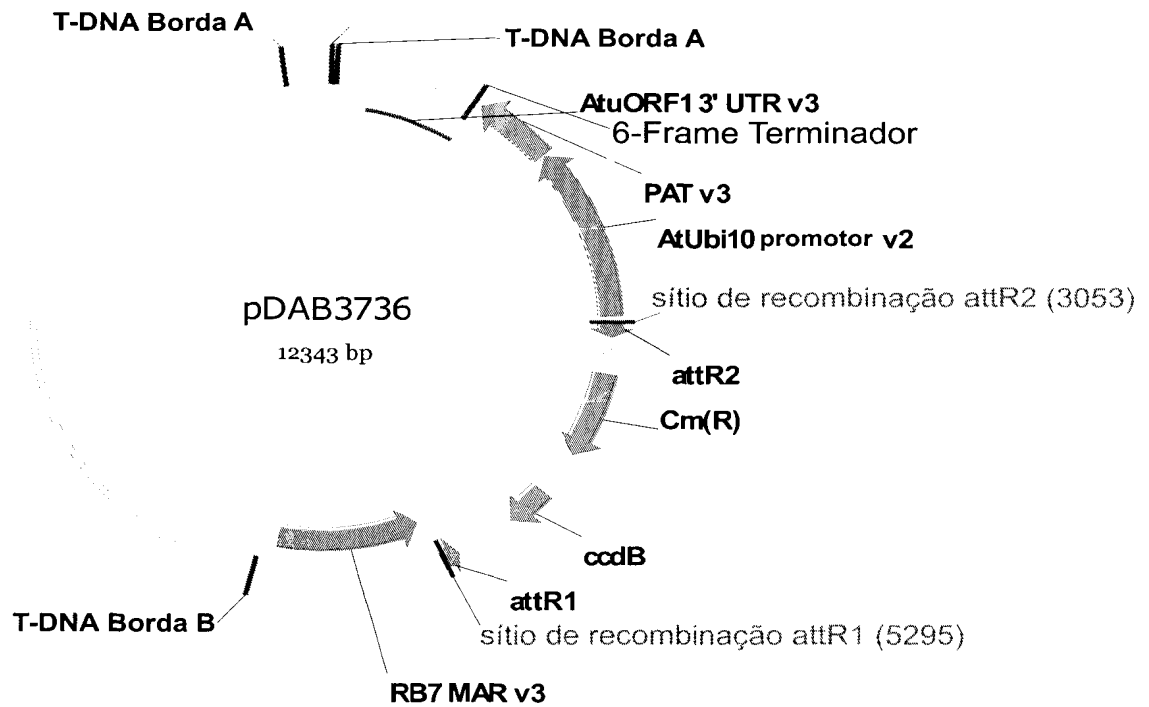


FIG. 7

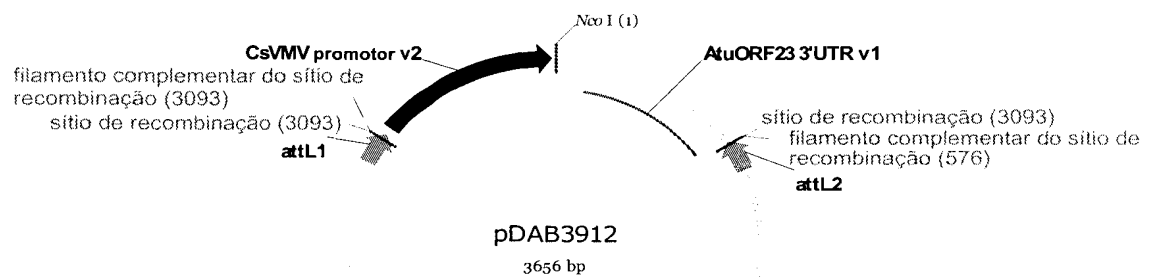


FIG. 8

filamento complementar do sítio de recombinação attL1(3741)

sítio de recombinação attL1(3741)

attL1

AtuMas promotor v4

Nco I (649)

Sac I (666)

pDAB3914

3761 bp

AtuORF23 3'UTR v1

sítio de recombinação attL2(1224)

filamento complementar do sítio de recombinação attL2(1224)

attL2

FIG. 9

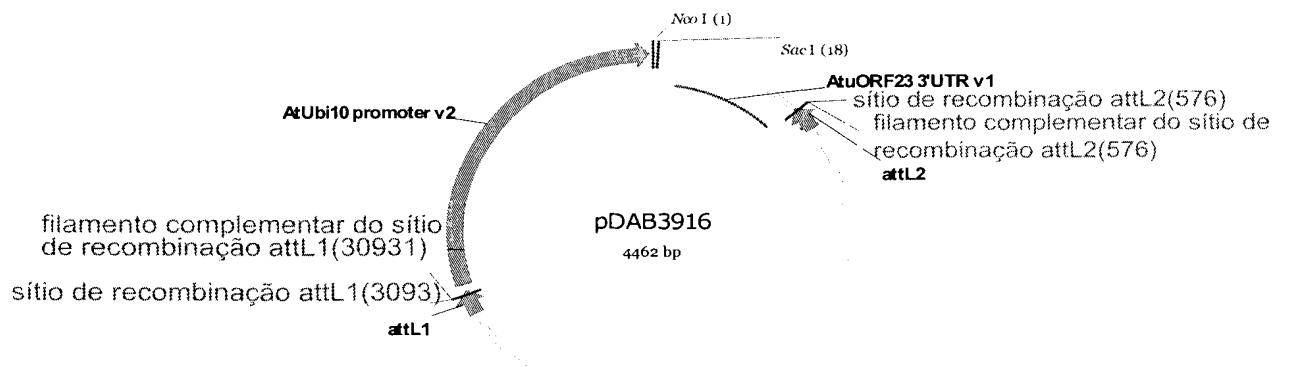


FIG. 10

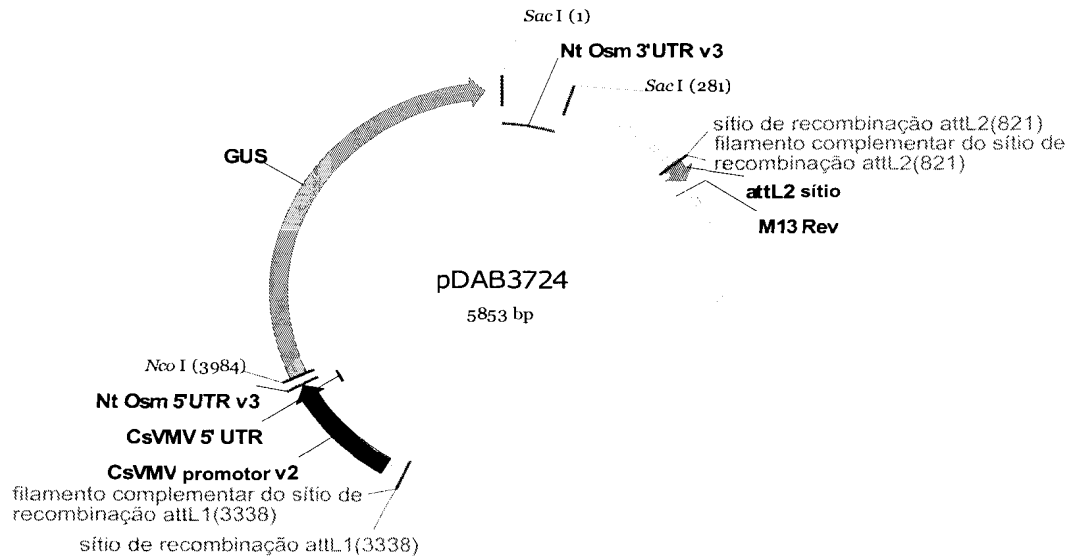


FIG. 11

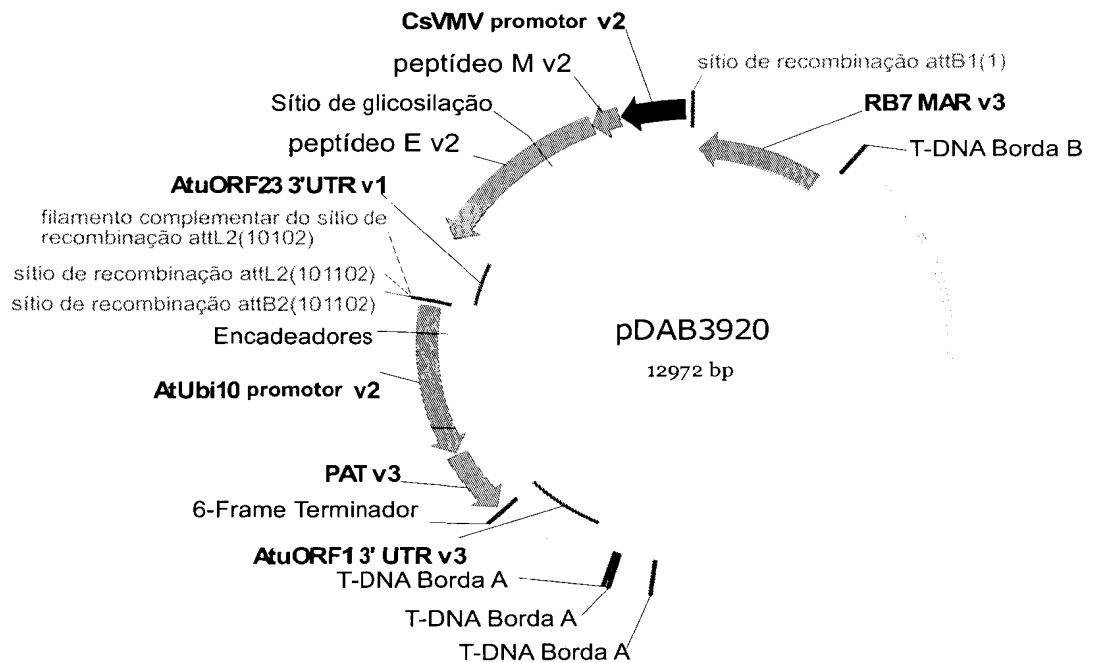


FIG. 12

7/21

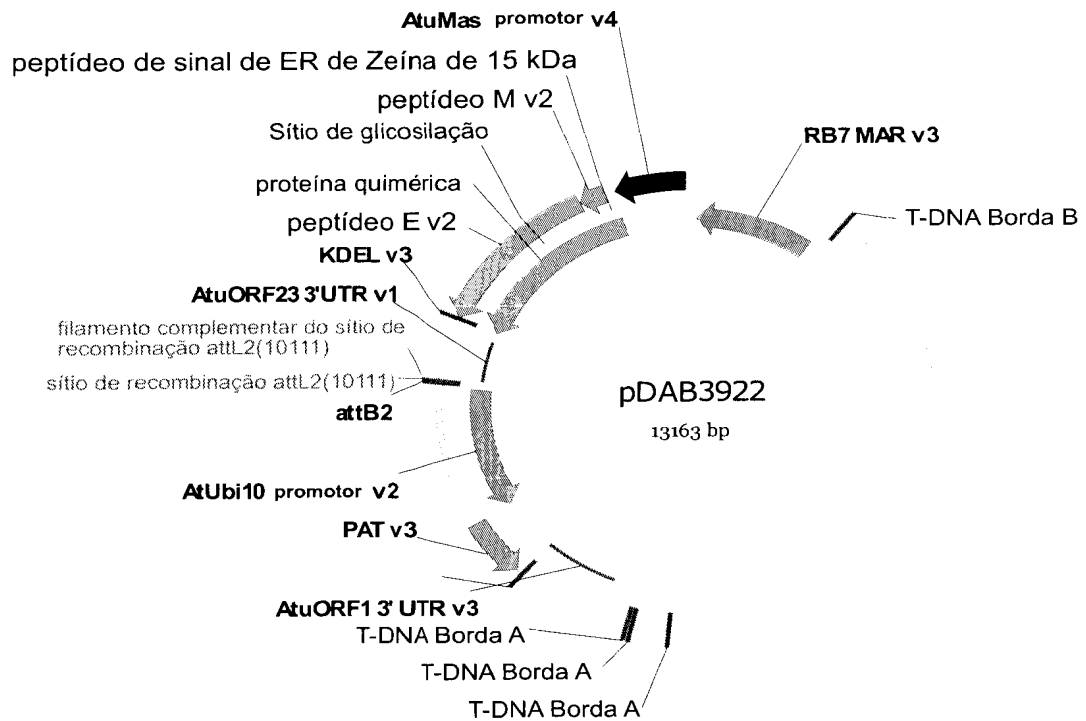


FIG. 13

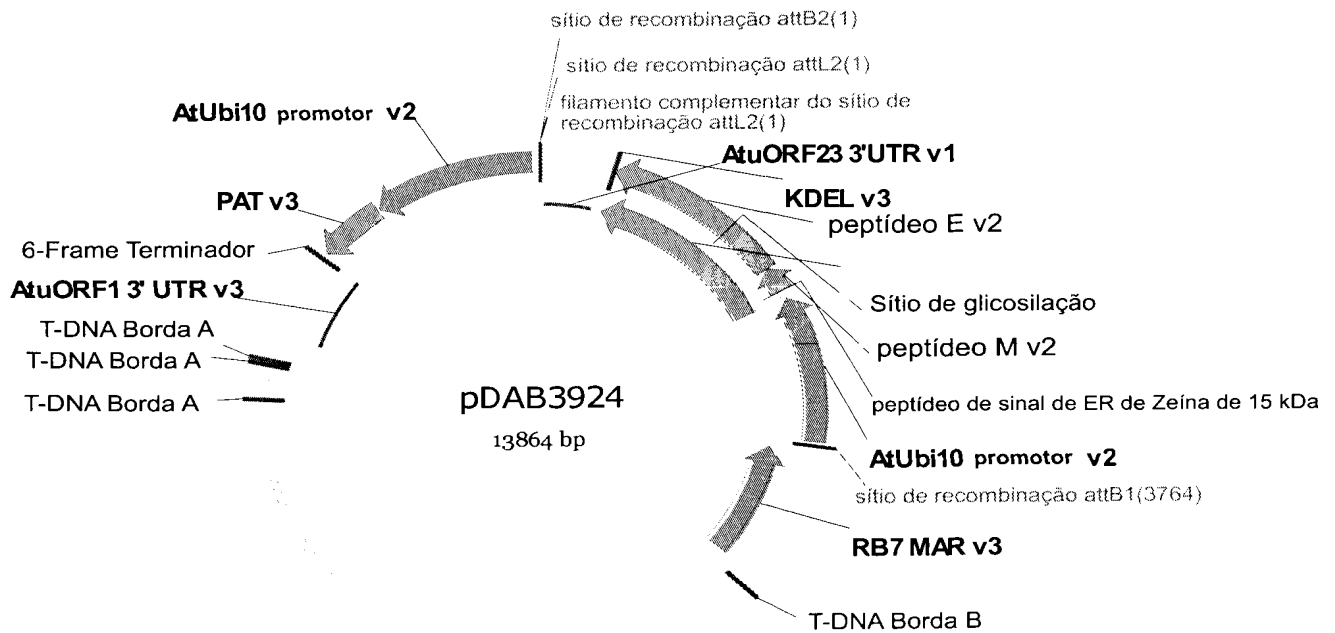


FIG. 14

8/21

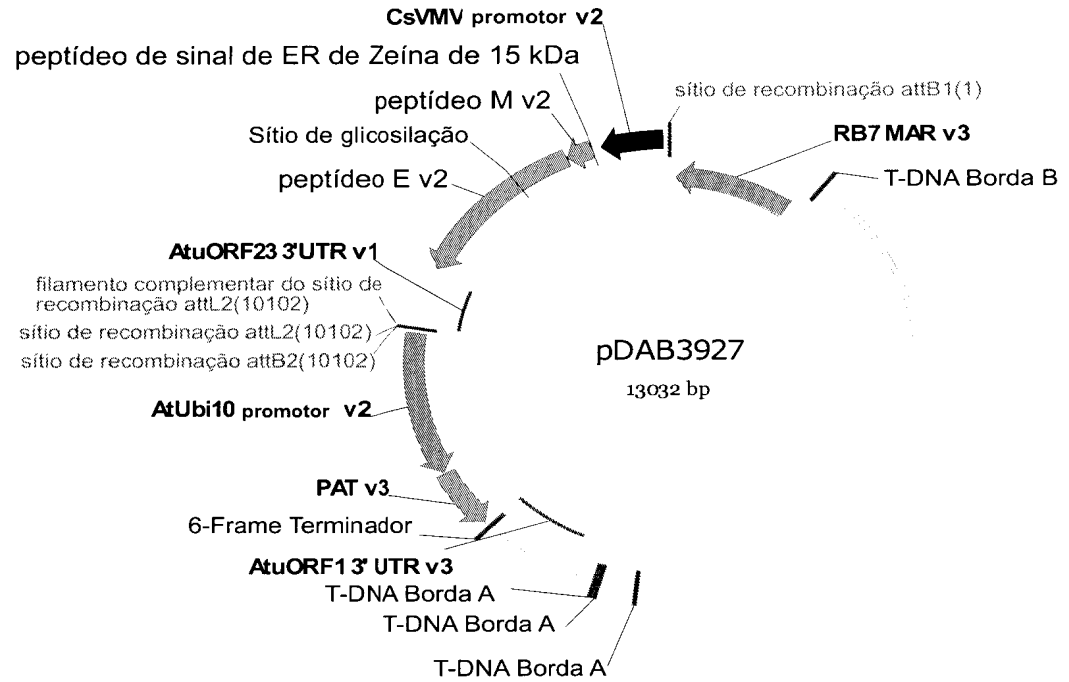


FIG. 15

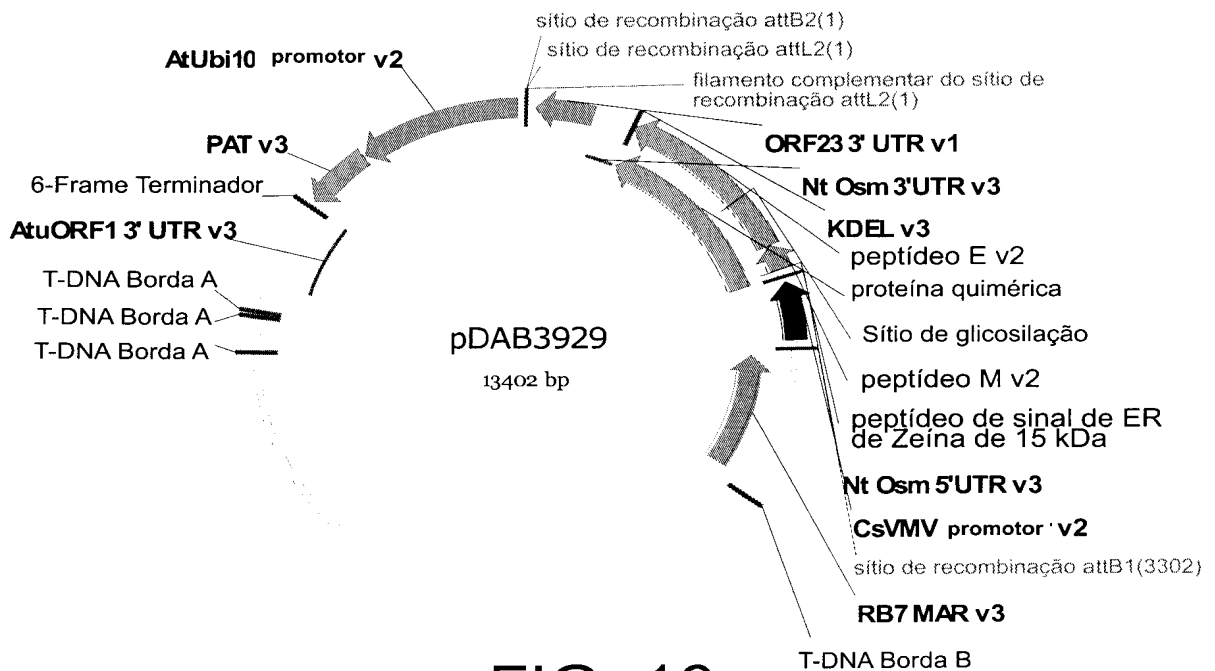


FIG. 16

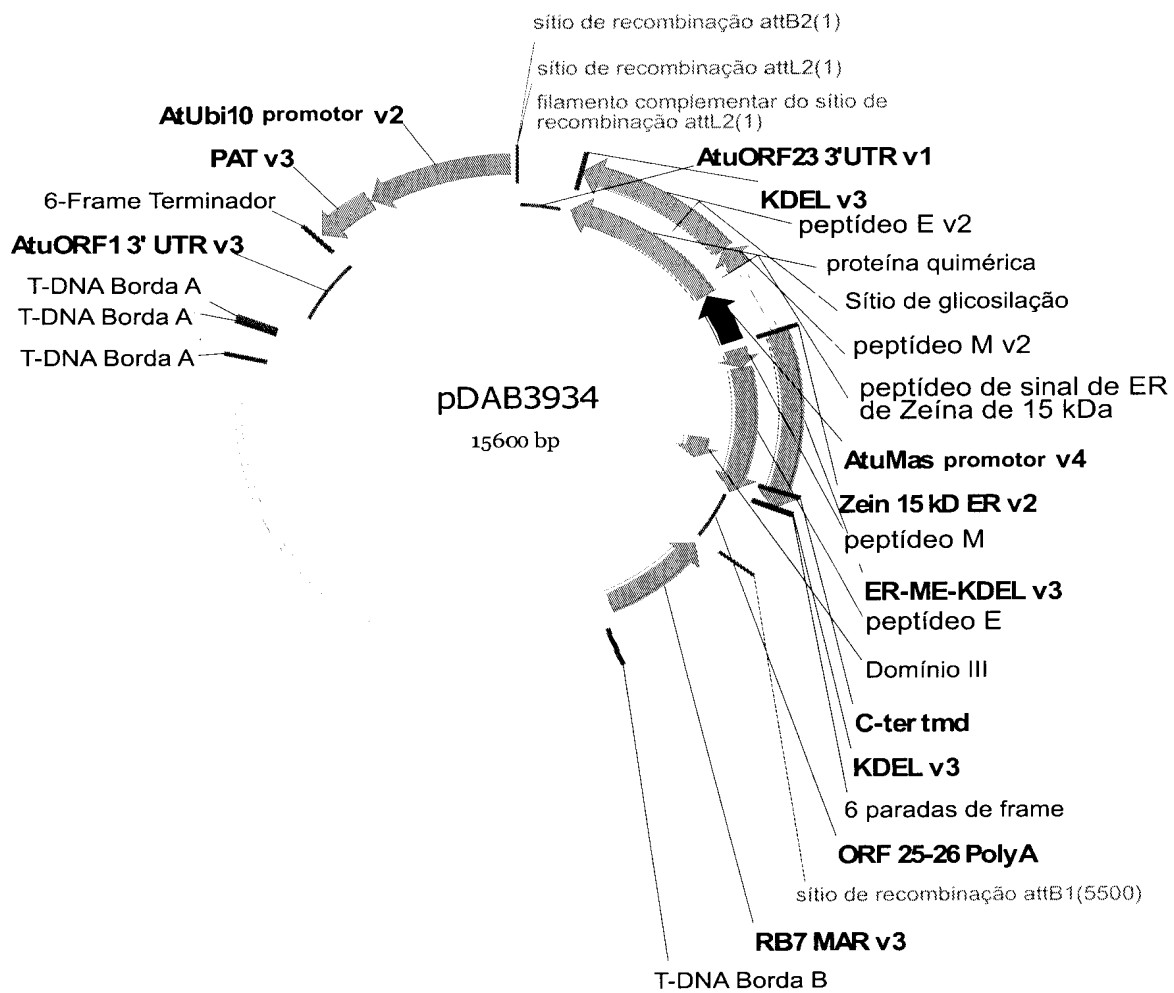


FIG. 17

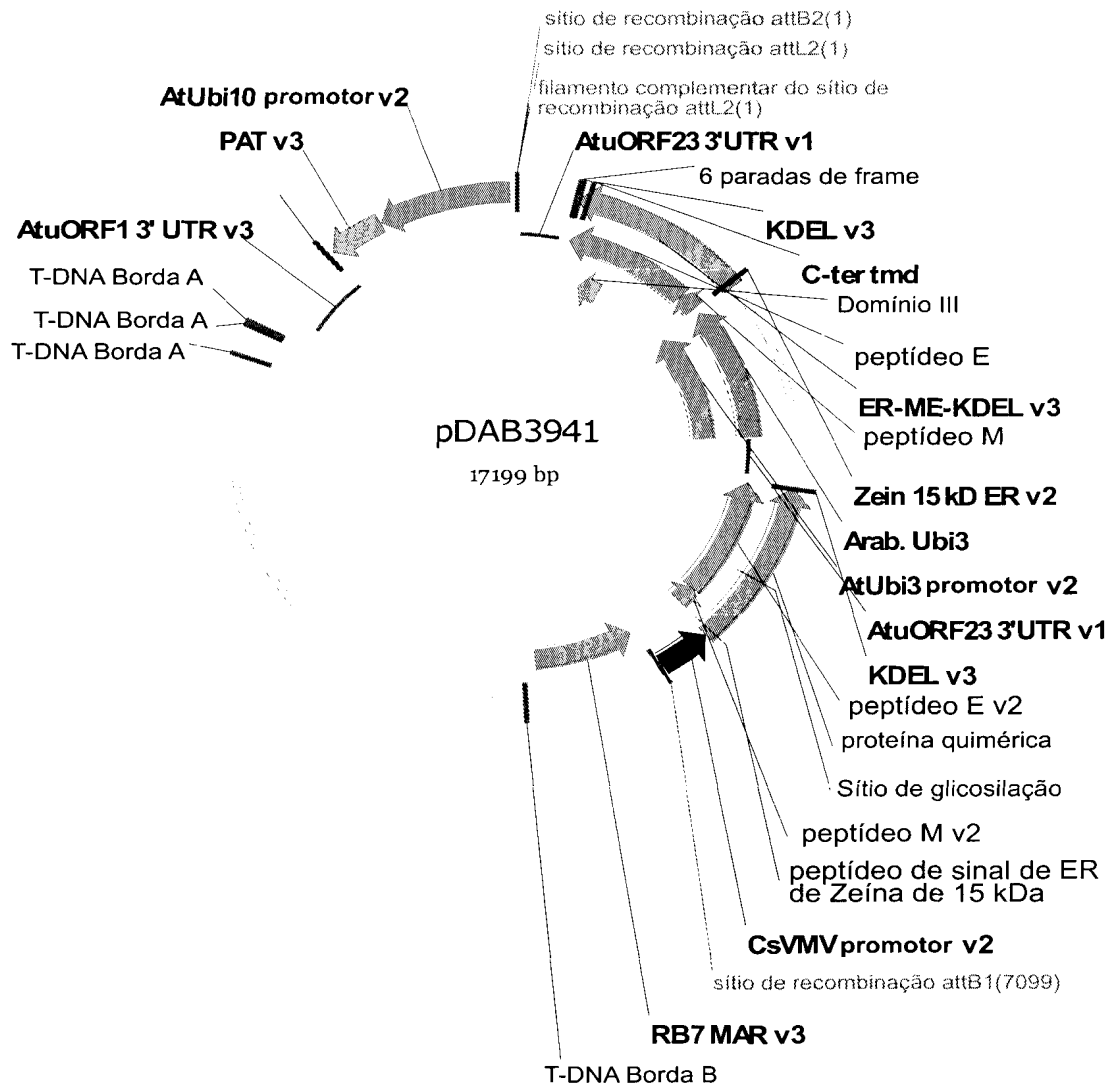


FIG. 18

11/21

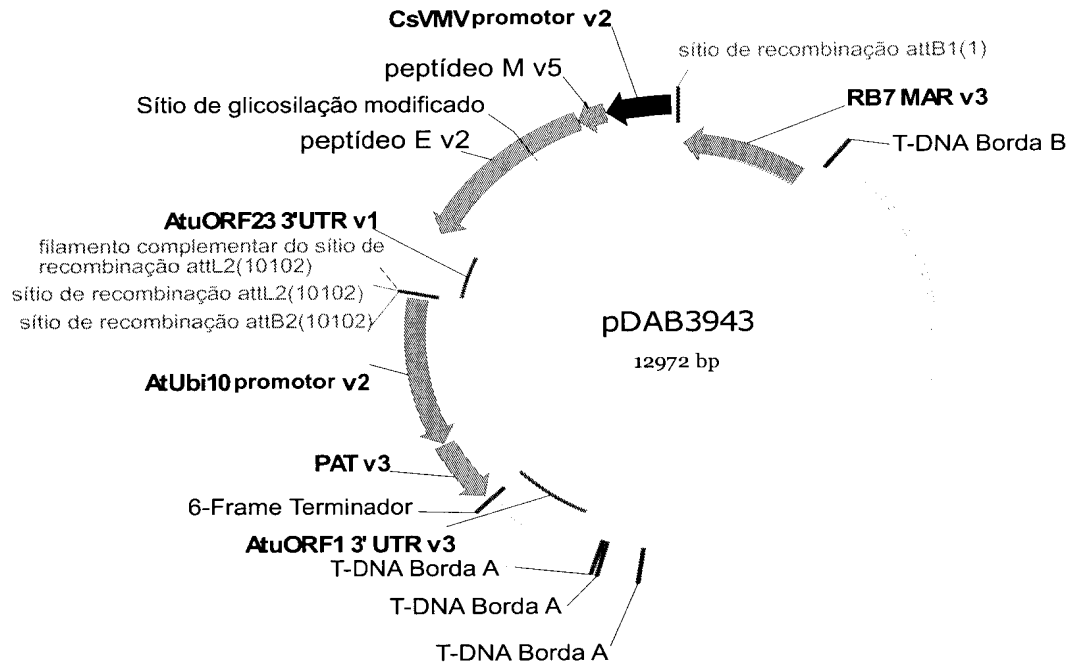


FIG. 19

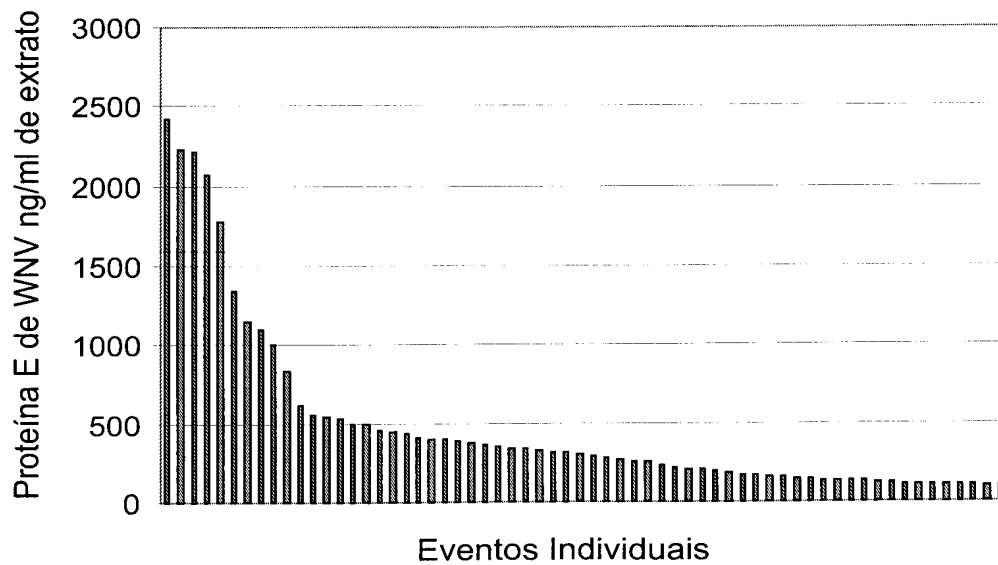


FIG. 20

12/21

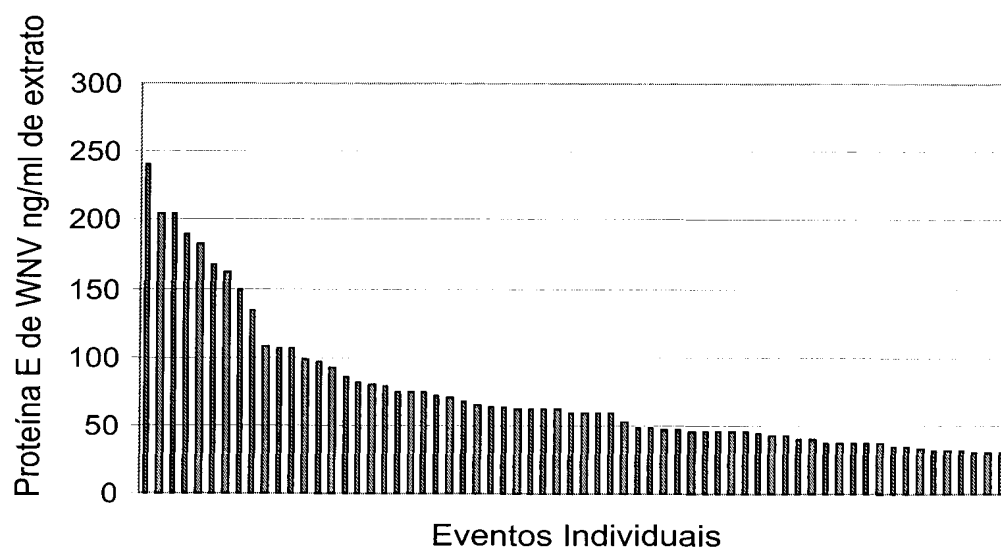


FIG. 21

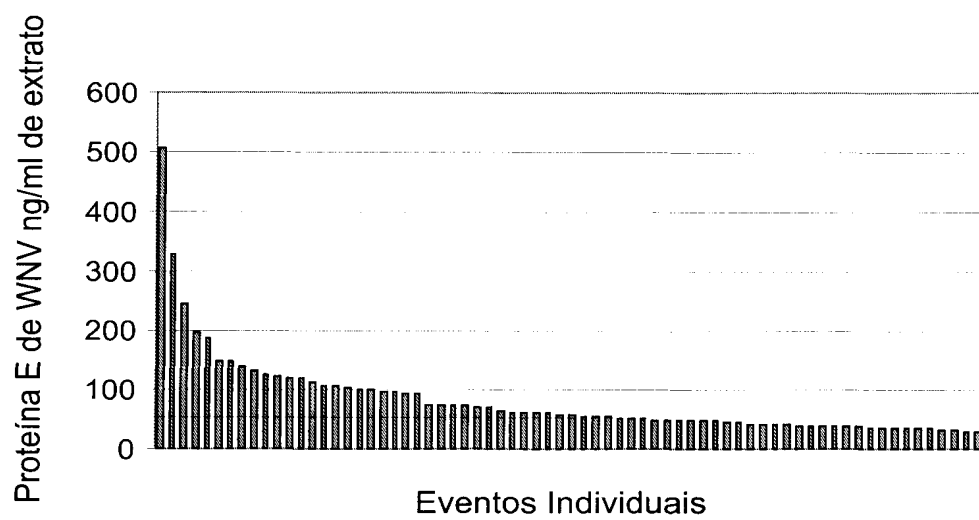


FIG. 22

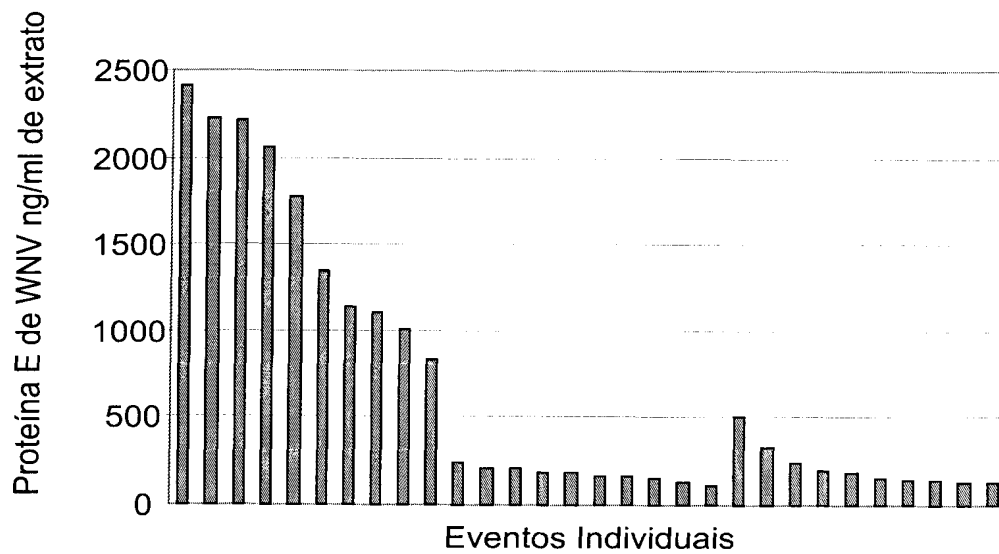


FIG. 23

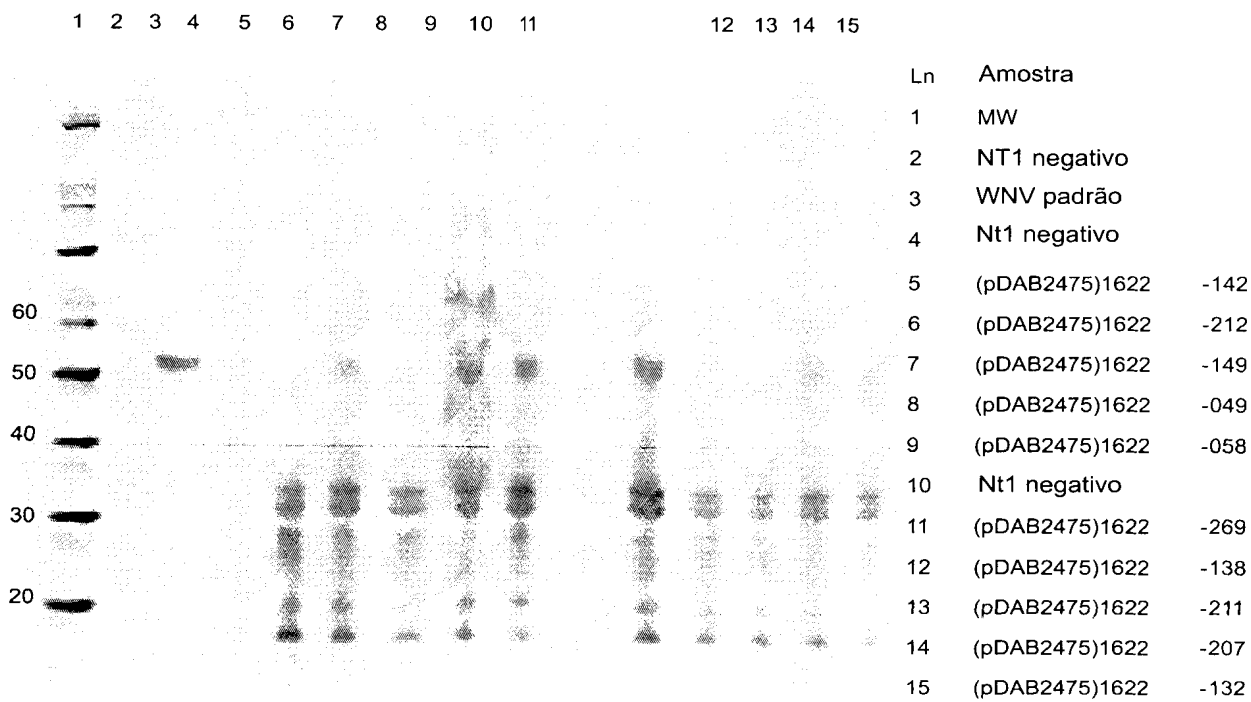
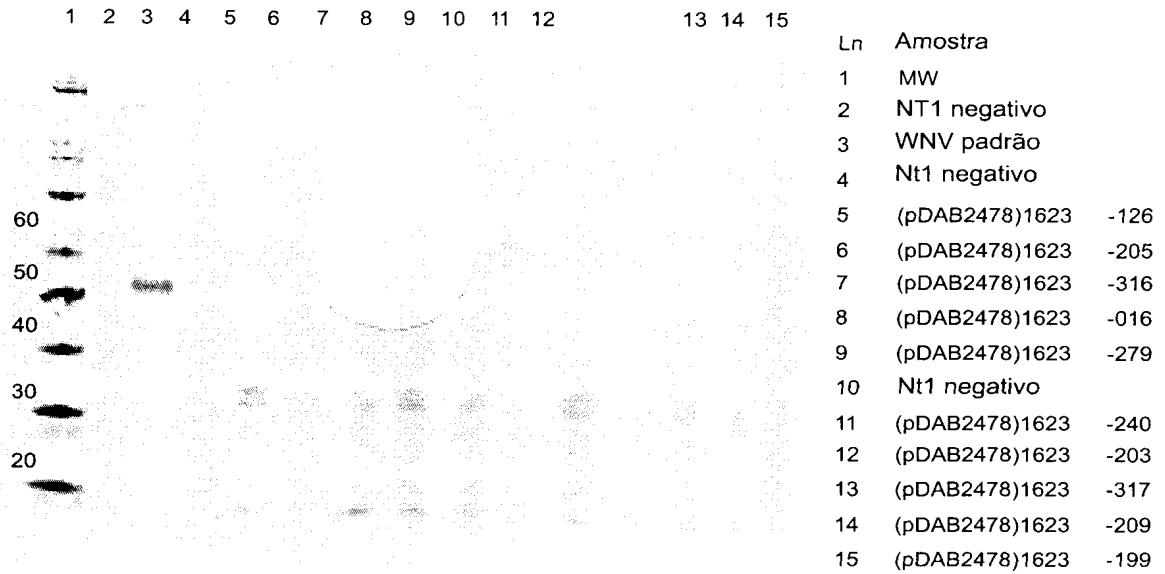


FIG. 24

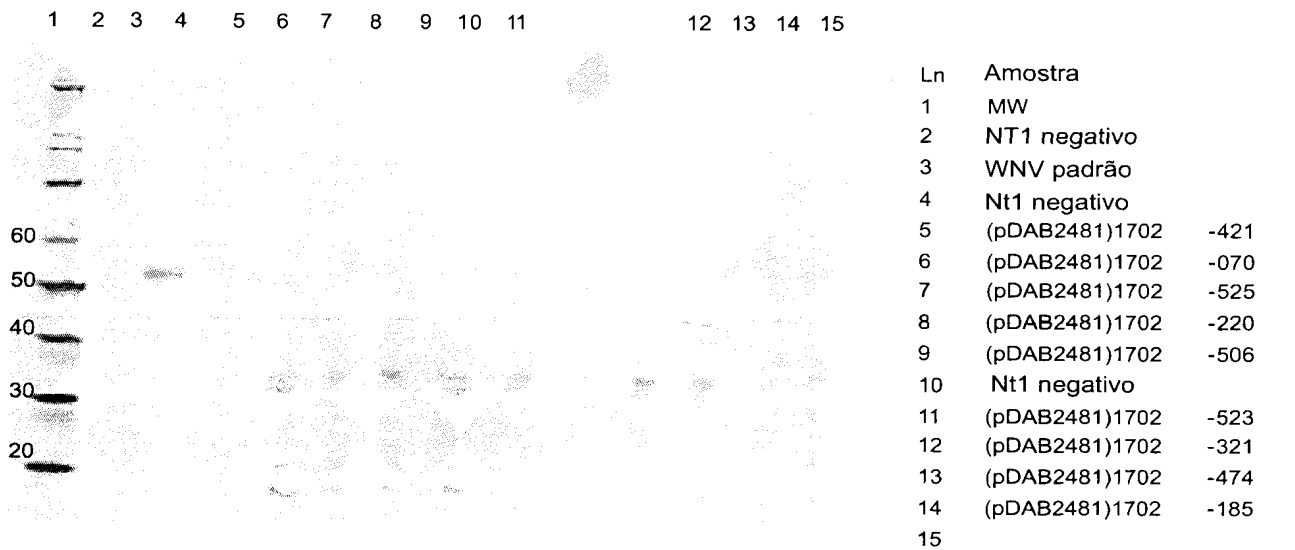
Todas mostram calo do dia 14
(pDAB2475)1622 – ME

14/21



Todas mostram calo do dia 14
(pDAB2478)1623 - prME

FIG. 25



Todas mostram calo do dia 14
(pDAB2481)1702 -
prME w/ modificação de glicano

FIG. 26

Comparação de Constructos WNV 1A (Calo do dia 14)

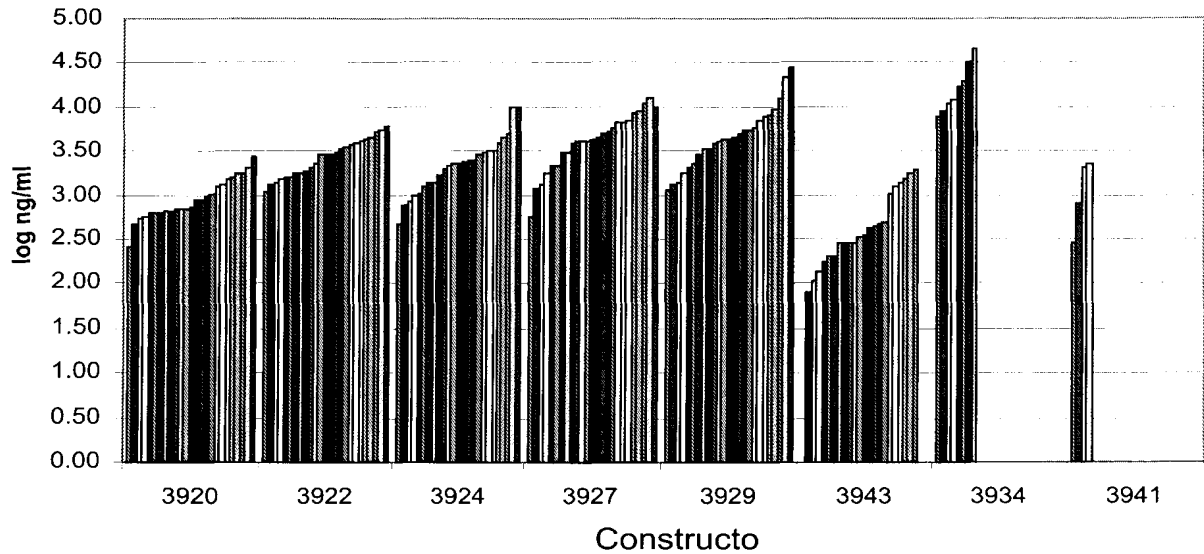
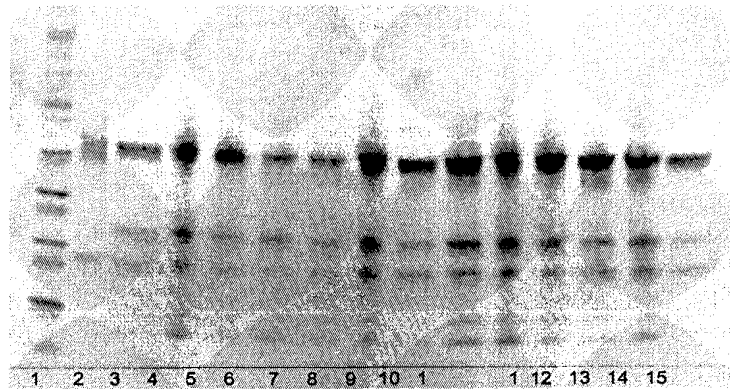


FIG. 27

Alameda

- 1 Vide Blue/Magic Mark
- 2 Planta de Referência (15 ng)
- 3 (pDAB2475) 1622 -207
- 4 (pDAB3920) 1960 -001
- 5 (pDAB3920) 1960 -005
- 6 (pDAB3920) 1960 -013
- 7 (pDAB3920) 1960 -015
- 8 (pDAB3920) 1960 -024
- 9 (pDAB2475) 1622 -207
- 10 (pDAB3922) 1961 -001
- 11 (pDAB3922) 1961 -002
- 12 (pDAB3922) 1961 -004
- 13 (pDAB3922) 1961 -006
- 14 (pDAB3922) 1961 -017
- 15 (pDAB2475) 1622 -207

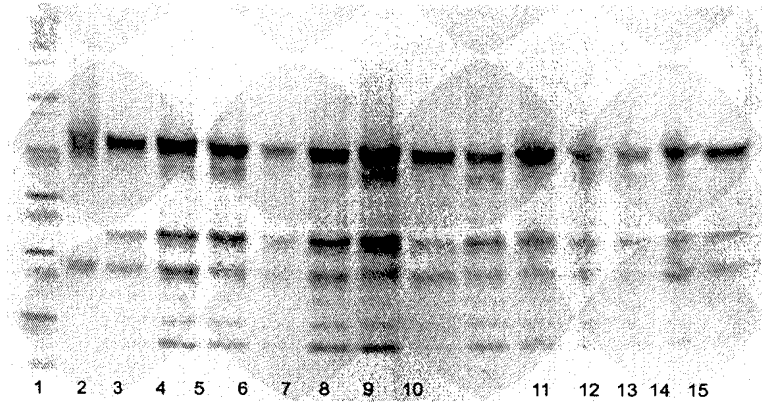


Todas mostram calo do dia 14
Normalizar carga para proteína solúvel total

FIG. 28

Alameda

- 1 Vide Blue/Magic Mark
- 2 Planta de Referência (15 ng)
- 3 (pDAB2475) 1622 -207
- 4 (pDAB3924) 1962 -001
- 5 (pDAB3924) 1962 -009
- 6 (pDAB3924) 1962 -014
- 7 (pDAB3924) 1962 -018
- 8 (pDAB3924) 1962 -024
- 9 (pDAB2475) 1622 -207
- 10 (pDAB3927) 1963 -004
- 11 (pDAB3927) 1963 -009
- 12 (pDAB3927) 1963 -013
- 13 (pDAB3927) 1963 -015
- 14 (pDAB3927) 1963 -023
- 15 (pDAB3927) 1622 -207

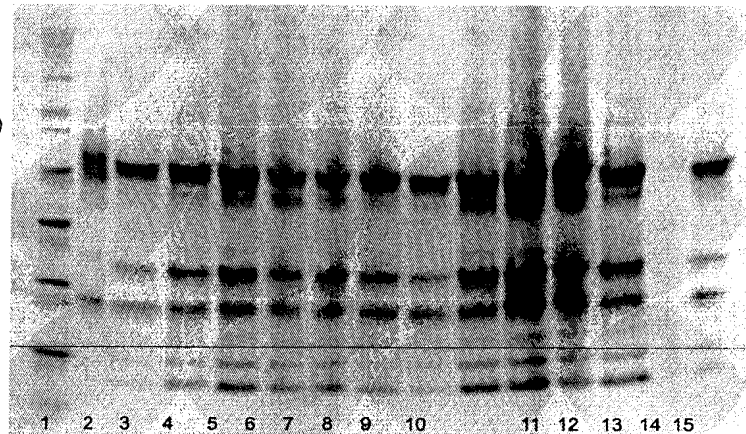


Todas mostram calo do dia 14
Normalizar carga para proteína solúvel total

FIG. 29

Alameda

- 1 Vide Blue/Magic Mark
- 2 Planta de Referência (15 ng)
- 3 (pDAB2475) 1622 -207
- 4 (pDAB3929) 1964 -001
- 5 (pDAB3929) 1964 -008
- 6 (pDAB3929) 1964 -013
- 7 (pDAB3929) 1964 -018
- 8 (pDAB3929) 1964 -024
- 9 (pDAB2475) 1622 -207
- 10 (pDAB3934) 2040 -003
- 11 (pDAB3934) 2040 -005
- 12 (pDAB3934) 2040 -007
- 13 (pDAB3934) 2040 -008
- 14 (pDAB3934) 2040 -009
- 15 (pDAB2475) 1622 -207



Todas mostram calo do dia 14
Normalizar carga para proteína solúvel total

FIG. 30

17/21

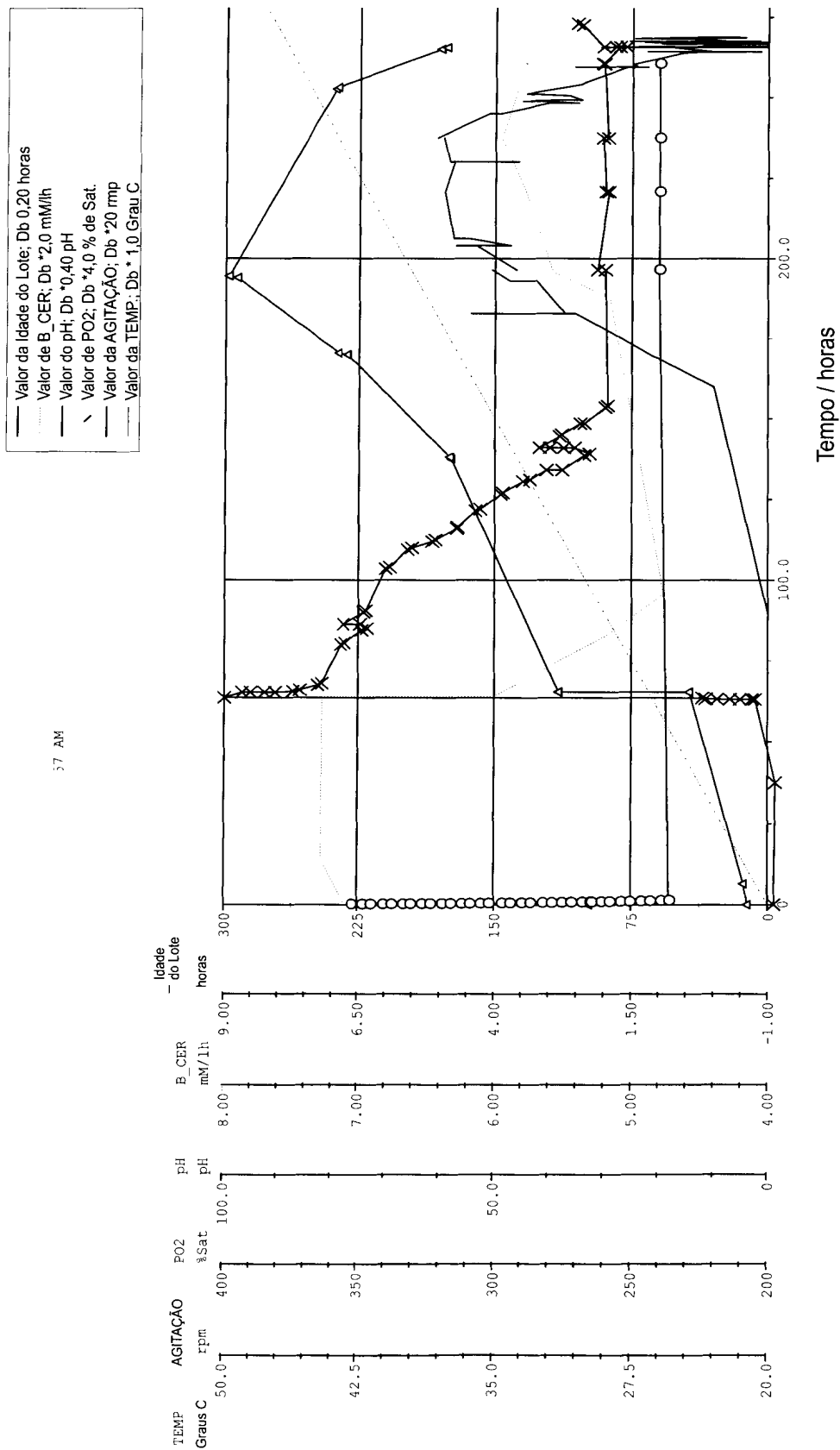


FIG. 31

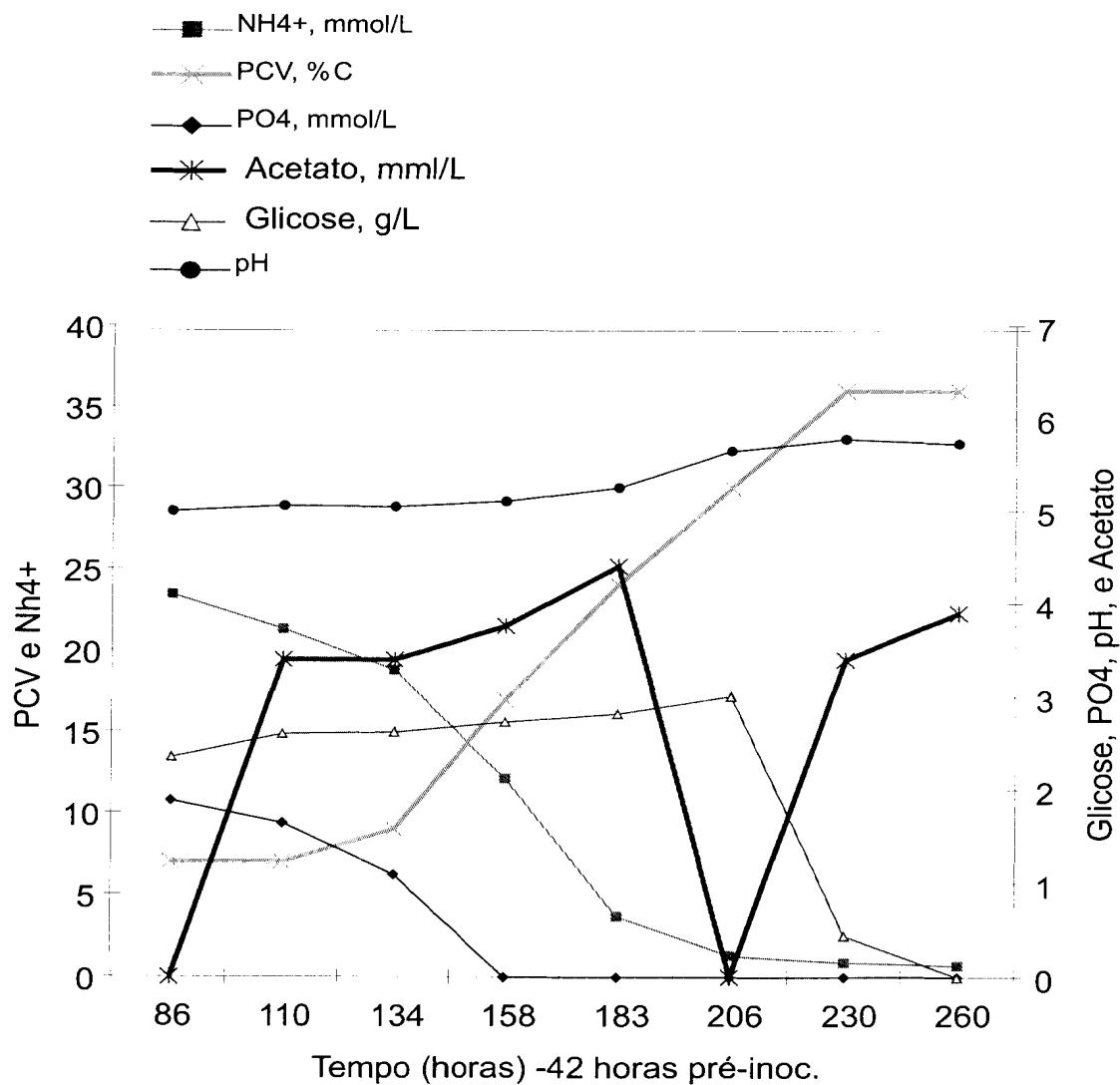


FIG. 32

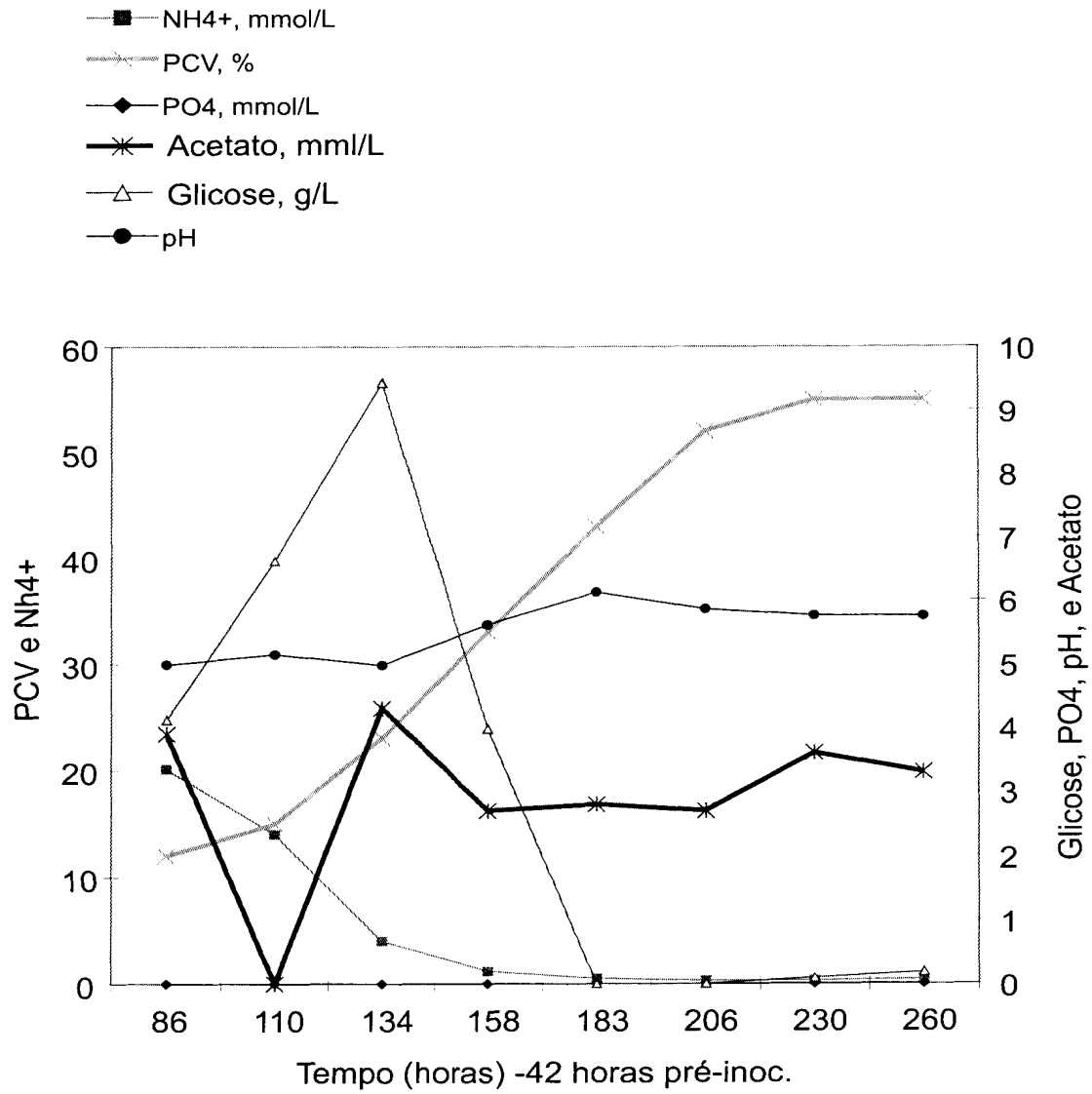


FIG. 33

20/21

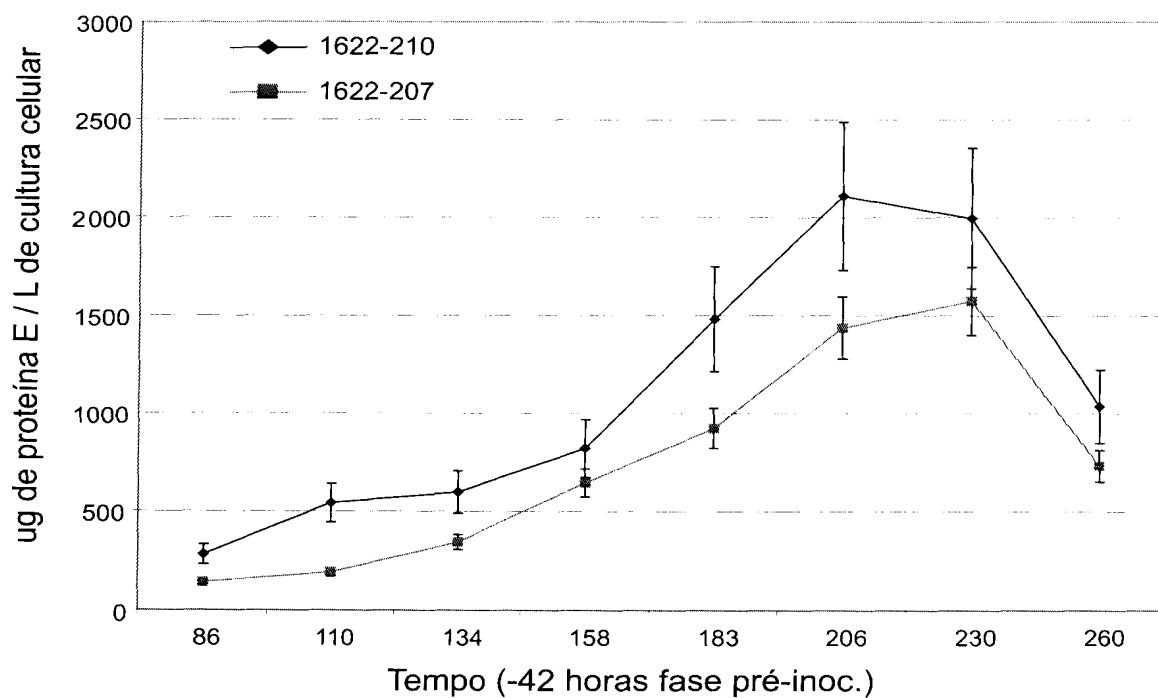


FIG. 34

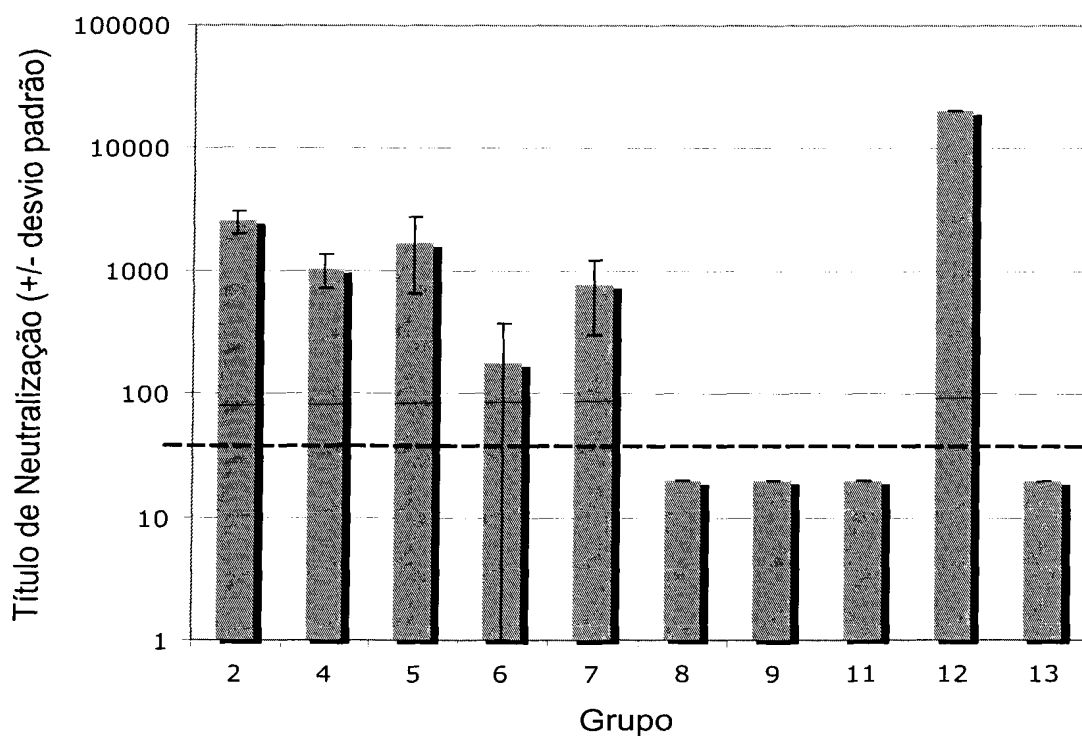


FIG. 35

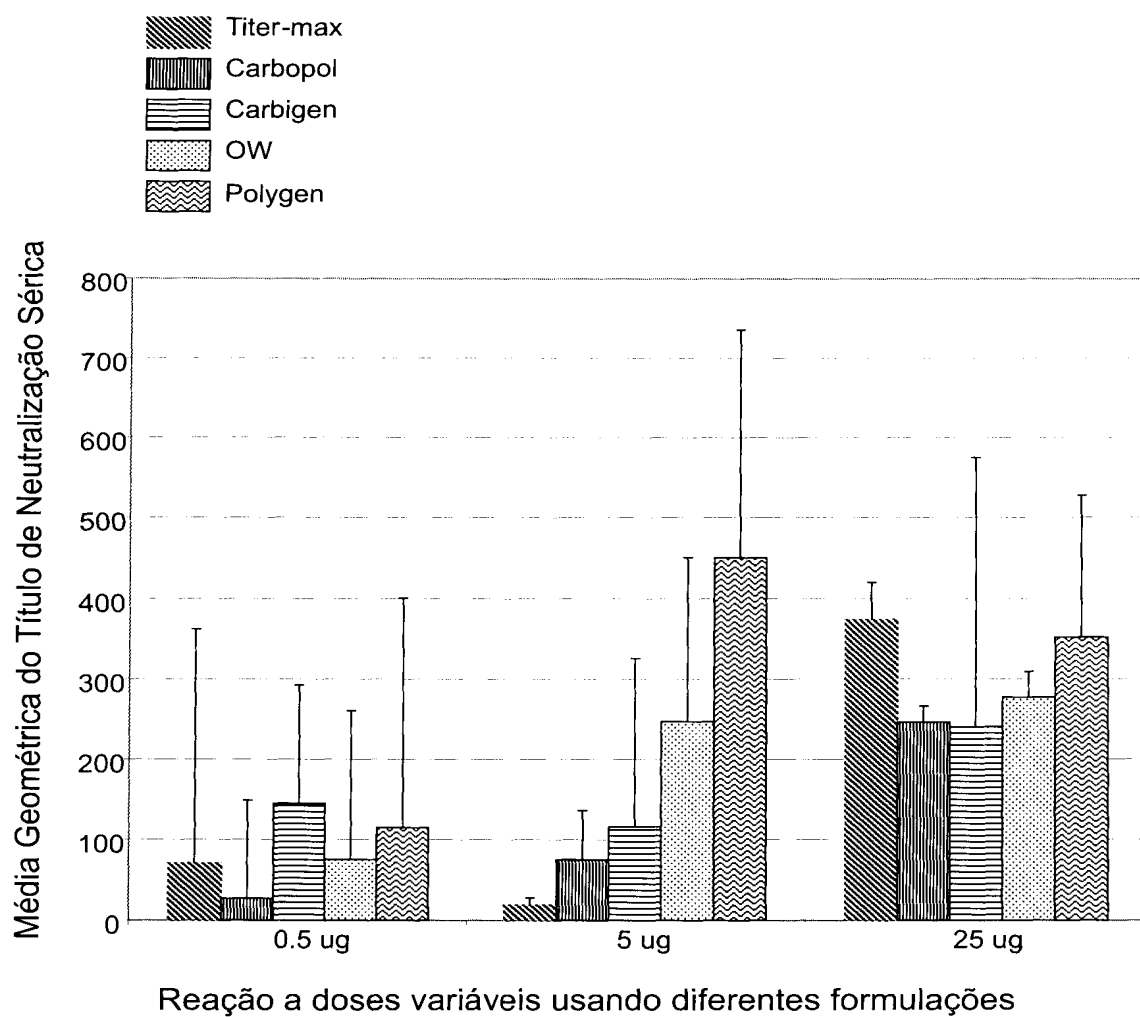


FIG. 36

RESUMO

Patente de Invenção: "VACINAS DO VÍRUS WEST NILE (WNV) PRODUZIDAS POR PLANTAS, VETORES E SEQUÊNCIAS OTIMIZADAS DE CÓDONS DE PLANTAS".

- 5 O presente pedido proporciona várias composições de substâncias direcionadas para polipeptídeos do vírus West Nile (WNV) e fragmentos dos mesmos e polinucleotídeos, vetores e células hospedeiras transformadas que codificam, dirigem a expressão de, ou produzem polipeptídeos WNV conforme determinado aqui, neste pedido de patente. Métodos para usar os
- 10 polipeptídeos e polinucleotídeos para a produção de reações imunes em indivíduos ou detectar a presença de anticorpos neutralizantes ou WNV específicos também são proporcionados aqui, neste pedido de patente.