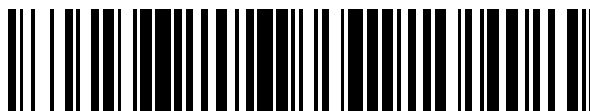


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 348**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2003 E 10177735 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2338508**

54 Título: **Un virus del dengue quimérico recombinante rDEN3/4delta 30(ME), rDEN2/4delta30(ME) o rDEN1/4delta30(ME) que contiene una delección de 30 nucleótidos (delta30) en una sección de la región no traducida en 3' del genoma del dengue de tipo 4, en donde dicha delección de 30 nucleótidos se corresponde con la estructura tallo-bucle de TL2**

30 Prioridad:

03.05.2002 US 377860 P
23.12.2002 US 436500 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2018

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
National Institutes of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325 Rockville, MD 20852-3804, US

72 Inventor/es:

WHITEHEAD, STEPHEN S.;
MURPHY, BRIAN R.;
MARKOFF, LEWIS;
FALGOUT, BARRY;
BLANEY, JOSEPH;
HANLEY, KATHRYN y
LAI, CHING-JUH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 677 348 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un virus del dengue quimérico recombinante rDEN3/4delta 30(ME), rDEN2/4delta30(ME) o rDEN1/4delta30(ME) que contiene una delección de 30 nucleótidos (delta30) en una sección de la región no traducida en 3' del genoma del dengue de tipo 4, en donde dicha delección de 30 nucleótidos se corresponde con la estructura tallo-bucle de TL2

Campo de la invención

La divulgación se refiere a una vacuna contra el virus del dengue que contiene virus del dengue quiméricos de serotipos 1, 2, 3 y 4 y que comprende una delección común de 30 nucleótidos ($\Delta 30$) en la región no traducida en 3' del genoma del virus del dengue serotipos 1, 2, 3 y 4.

Antecedentes de la invención

El virus del dengue es un virus de ARN de sentido positivo que pertenece al género *Flavivirus* de la familia Flaviviridae. El virus del dengue está ampliamente distribuido por todas las regiones tropicales y semitropicales del mundo y se transmite a seres humanos por vectores de mosquitos. El virus del dengue es una causa importante de hospitalización y muerte en niños en al menos ocho países asiáticos tropicales (WHO 1997 Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control 2ª edición, Ginebra). Hay cuatro serotipos de virus del dengue (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4) que provocan anualmente unos 50-100 millones de casos estimados de fiebre del dengue y 500.000 casos de la forma más grave de infección por virus del dengue conocida como fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue (FHD/SCD) (Gubler, D.J. y Meltzer, M. 1999 Adv Virus Res 53: 35-70). Esta última enfermedad se observa predominantemente en niños y adultos que experimentan una segunda infección por virus del dengue con un serotipo diferente del de su primera infección por virus del dengue y en infección primaria de lactantes que todavía tienen anticuerpo materno específico del dengue en circulación (Burke, D.S. *et al.* 1988 Am J Trop Med Hyg 38:172-180; Halstead, S.B. *et al.* 1969 Am J Trop Med Hyg 18:997-1021; Thein, S. *et al.* 1997 Am J Trop Med Hyg 56:566-575). Es necesaria una vacuna contra el dengue para atenuar la carga de la enfermedad provocada por el virus del dengue, pero no se ha autorizado ninguna. Debido a la asociación de una enfermedad más grave con la infección secundaria por virus del dengue, una vacuna satisfactoria debe inducir simultáneamente inmunidad para los cuatro serotipos. La inmunidad está mediada principalmente por un anticuerpo neutralizante dirigido contra la glucoproteína de la envoltura (E), una proteína estructural del virión. La infección con un serotipo induce inmunidad homotípica de larga duración y una inmunidad heterotípica de corta duración (Sabin, A. 1955 Am J Trop Med Hyg 4:198-207). Por tanto, el objetivo de la inmunización es inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes de larga duración contra DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, lo que puede lograrse de la mejor manera desde el punto de vista económico usando vacunas de virus atenuados vivos. Este es un objetivo razonable puesto que ya se ha desarrollado una vacuna de virus atenuado vivo para el virus de la fiebre amarilla relacionado, otro flavivirus transmitido por mosquitos presente en regiones tropicales y semitropicales del mundo (Monath, T.P. y Heinz, F.X. 1996 en: Fields Virology, Fields, D.M *et al.* eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, págs. 961-1034).

Se han desarrollado varios candidatos a vacuna contra el dengue atenuado vivo y se han evaluado en seres humanos y primates no humanos. Los primeros candidatos a vacuna contra el dengue atenuado vivo fueron mutantes de espectro de hospedadores desarrollados mediante pase en serie de virus del dengue de tipo natural en los cerebros de ratones y selección de mutantes atenuados para seres humanos (Kimura, R. y Hotta, S. 1944 Jpn J Bacteriol 1:96-99; Sabin, A.B. y Schlesinger, R.W. 1945 Science 101:640; Wisserman, C.L. *et al.* 1963 Am J Trop Med Hyg 12:620-623). Aunque estos virus candidatos a vacuna eran inmunogénicos en seres humanos, su escaso crecimiento en cultivo celular desaconsejó el desarrollo adicional. Se han desarrollado candidatos a vacuna de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 atenuados vivos mediante pase en serie en cultivo de tejido no humano (Angsubhakom, S. *et al.* 1994 Southeast Asian J Trop Med Public Health 25:554-559; Bancroft, W.H. *et al.* 1981 Infect Immun 31:698-703; Bhamarapravati, N. *et al.* 1987 Bull World Health Organ 65:189-195; Eckels, K.H. *et al.* 1984 Am J Trop Med Hyg 33: 684-698; Hoke, C.H. Jr. *et al.* 1990 Am J Trop Med Hyg 43:219-226; Kanesa-Thanan, N. *et al.* 2001 Vaccine 19: 3179-3188) o mediante mutagénesis química (McKee, K.T. *et al.* 1987 Am J Trop Med Hyg 36:435-442). Se ha comprobado que es muy difícil lograr un equilibrio satisfactorio entre atenuación e inmunogenicidad para cada uno de los cuatro serotipos de virus del dengue usando estos enfoques y formular una vacuna tetravalente que sea segura e inmunogénica de manera satisfactoria contra cada uno de los cuatro virus del dengue (Kanesa-Thanan, N. *et al.* 2001 Vaccine 19:3179-3188; Bhamarapravati, N. y Sutee, Y. 2000 Vaccine 18:44-47).

Dos importantes avances usando tecnología de ADN recombinante han hecho posible recientemente desarrollar candidatos a vacuna contra virus del dengue atenuados vivos prometedores adicionales. En primer lugar, se han desarrollado métodos para recuperar virus del dengue infeccioso a partir de células transfectadas con transcritos de ARN derivados de un clon de ADNc de longitud completa del genoma del virus del dengue, haciendo así posible derivar virus infecciosos que portan mutaciones atenuantes que se han introducido en el clon de ADNc mediante mutagénesis dirigida al sitio (Lai, C.J. *et al.* 1991 PNAS USA 88:5139-5143). En segundo lugar, es posible producir virus quiméricos antigénicos en los que la región que codifica para proteínas estructurales del clon de ADNc de longitud completa del virus del dengue se reemplaza por la de un serotipo de virus del dengue diferente o de un

flavivirus más divergente (Bray, M. y Lai, C.J. 1991 PNAS USA 88:10342-10346; Chen, W. *et al.* 1995 J Virol 69:5186-5190; Huang, C.Y. *et al.* 2000 J Virol 74: 3020-3028; Pletnev, A.G. y Men, R 1998 PNAS USA 95:1746-1751). Se han usado estas técnicas para construir virus del dengue quiméricos intertipicos que han mostrado ser eficaces en la protección de monos frente a la exposición a virus del dengue homólogo (Bray, M. *et al.* 1996 J Virol 70:4162-4166). También está usándose una estrategia similar para desarrollar vacunas contra virus del dengue quiméricos antigénicos atenuados basándose en la atenuación del virus de la vacuna contra la fiebre amarilla o la atenuación de virus del dengue sometidos a pase en cultivo celular (Monath, T.P. *et al.* 1999 Vacuna 17:1869-1882; Huang, C.Y. *et al.* 2000 J. Virol 74:3020-3028).

Otro estudio examinó el nivel de atenuación para seres humanos de un mutante de DEN4 que portaba una delección de 30 nucleótidos ($\Delta 30$) introducida en su región no traducida en 3' mediante mutagénesis dirigida al sitio y que se encontró previamente que estaba atenuado para monos rhesus (Men, R. *et al.* 1996 J Virol 70:3930-3937). Se llevaron a cabo estudios adicionales para examinar si esta mutación $\Delta 30$ presente en el candidato a vacuna de DEN4 era el determinante principal de su atenuación para monos. Se descubrió que la mutación $\Delta 30$ era de hecho el determinante principal de la atenuación para monos, y que especificaba un equilibrio satisfactorio entre atenuación e inmunogenicidad para seres humanos (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13).

Lai *et al.* (*Clinical and Diagnostic Virology* 10 (1998) 173-179) describe una evaluación de determinadas estrategias moleculares para desarrollar una vacuna del dengue vivo. Construyeron ADNc quimérico intertípico en el que los genes de C-PreM-E o solo los genes de proteína estructural PreM-E del ADNc de longitud completa de DEN4 se sustituyeron con los correspondientes genes de DEN1, DEN2 o DEN3. Esto dio como resultado virus quiméricos viables que expresaron las proteínas estructurales protectoras de DEN1, DEN2 o DEN3 frente a un fondo de proteínas no estructurales de DEN4. Se descubrió que las quimeras presentaban la antigenicidad predicha del dengue de tipo 1, 2 o 3, y fueron infecciosas para los monos y capaces de inducir inmunidad protectora.

Sumario de la invención

La mutación atenuante $\Delta 30$ previamente identificada, creada en el virus del dengue tipo 4 (DEN4) mediante la eliminación de 30 nucleótidos de la 3'-UTR, también puede atenuar una cepa de tipo silvestre del virus del dengue tipo 1 (DEN1). La eliminación de 30 nucleótidos de la 3'-UTR de DEN1 en una región altamente conservada homóloga a la región de DEN4 que abarca la mutación $\Delta 30$ produjo un virus recombinante atenuado en monos rhesus en un nivel similar al virus recombinante DEN4 $\Delta 30$. Esto establece la transportabilidad de la mutación $\Delta 30$ y su fenotipo de atenuación para un tipo de virus del dengue distinto de DEN4. La transferibilidad eficaz de la mutación $\Delta 30$, descrita en este trabajo, establece la utilidad de la mutación $\Delta 30$ para atenuar y mejorar la seguridad de vacunas contra el virus del dengue comercializables de cualquier serotipo. Los presentes inventores prevén una vacuna tetravalente contra el virus del dengue que contiene virus del dengue de los tipos 1, 2, 3 y 4, cada uno atenuado mediante la mutación $\Delta 30$. Los presentes inventores también prevén una vacuna contra el virus del dengue tetravalente que contiene virus quiméricos antigénicos recombinantes en los que los genes estructurales del virus del dengue tipos 1, 2 y 3 reemplazan a los de DEN4 $\Delta 30$; 1, 2 y 4 reemplazan a los de DEN3 $\Delta 30$; 1, 3 y 4 reemplazan a los de DEN2 $\Delta 30$; y 2, 3 y 4 reemplazan a los de DEN1 $\Delta 30$. En algunos casos, tales virus del dengue quiméricos están atenuados no solo mediante la mutación $\Delta 30$, sino también por su naturaleza quimérica. La presencia de la mutación atenuante $\Delta 30$ en cada componente de virus impide la reversión a un virus de tipo natural por recombinación intertípica. Además, debido a la estabilidad genética inherente a las mutaciones de delección, la mutación $\Delta 30$ representa una excelente alternativa para el uso como una mutación común compartida entre cada componente de la vacuna tetravalente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La vacuna tetravalente contra el virus del dengue atenuado vivo contiene virus del dengue que representan cada uno de los 4 serotipos, conteniendo cada serotipo su conjunto completo de proteínas estructurales y no estructurales de tipo silvestre inalteradas y una mutación atenuante $\Delta 30$ compartida. La localización relativa de la mutación $\Delta 30$ en la región no traducida (UTR) en 3' de cada componente se indica mediante una flecha.

Figura 2. A. La mutación $\Delta 30$ elimina 30 nucleótidos contiguos (sombreados) de la 3'-UTR de DEN4. Los nucleótidos se numeran desde el extremo terminal 3'. B. Alineación de la secuencia de nucleótidos de la región TL2 de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 y sus derivados $\Delta 30$. También se muestra la región correspondiente para cada uno de los cuatro serotipos de DEN. Las letras mayúsculas indican homología de secuencia entre los 4 serotipos, el subrayado indica apareamiento de nucleótidos para formar la estructura de tallo. C. Estructura secundaria pronosticada de la región TL2 de cada serotipo de DEN. Los nucleótidos que se eliminan mediante la mutación $\Delta 30$ están en un recuadro (DEN1 - entre los nucleótidos 10562 - 10591, DEN2 Tonga/74 - entre los nucleótidos 10541 - 10570, DEN3 Sleman/78 - entre los nucleótidos 10535 - 10565, y DEN4 - entre los nucleótidos 10478 - 10507).

Figura 3. Niveles de viremia en monos rhesus inoculados con candidatos a vacuna rDEN4 que portan mutaciones derivadas 5-FU. Se inocularon grupos de cuatro o dos (rDEN4 y rDEN4 $\Delta 30$) monos con 5,0 log₁₀ UFP de virus por vía subcutánea. Se recogió suero diariamente y se determinaron los títulos de virus mediante ensayo de placas en

células *Vero*. El límite de detección del virus era de 0,7 log₁₀ UFP/ml. Se indican los títulos de virus medios para cada grupo.

5 Figura 4. Niveles de viremia en monos rhesus inoculados con candidatos a vacuna rDEN4 que portan pares de mutaciones de carga a alanina en NS5. Se inocularon grupos de cuatro o dos (rDEN4 y rDEN4Δ30) monos con 5,0 log₁₀ UFP de virus por vía subcutánea. Se recogió suero diariamente y se determinaron los títulos de virus mediante ensayo de placas en células *Vero*. El límite de detección del virus era de 1,0 log₁₀ UFP/ml. Se indican los títulos de virus medios para cada grupo. No se detectó viremia en ningún mono tras el día 4.

10 Figura 5. La mutación Δ30 atenúa tanto DEN1 como DEN4 para monos rhesus. Se inmunizaron grupos de 4 monos por vía subcutánea con 5,0 log₁₀ UFP del virus indicado. Se recogió suero cada día tras la inmunización y se determinaron los títulos de virus y se muestran como log₁₀ UFP/ml media.

15 Figura 6. A. Diagrama del plásmido de ADNc de longitud completa p2 (Tonga/74). Las regiones subclonadas se indican por encima del plásmido. La numeración comienza en el extremo 5' de la secuencia vírica. B. La mutación Δ30 elimina los 30 nucleótidos indicados de la secuencia de 3'-UTR para crear p2Δ30.

20 Figura 7. Niveles de viremia en monos rhesus inoculados con los candidatos a vacuna DEN2 (Tonga/74), rDEN2 y rDEN2Δ30. Se inocularon grupos de cuatro monos con 5,0 log₁₀ UFP de virus por vía subcutánea. Se recogió suero diariamente y se determinaron los títulos de virus mediante ensayo de placas en células *Vero*. El límite de detección del virus era de 0,7 log₁₀ UFP/ml. Se indican los títulos de virus medios para cada grupo. No se detectó viremia en ningún mono tras el día 8.

25 Figura 8. A. Diagrama del plásmido de ADNc de longitud completa p3 (Sleman/78). Las regiones subclonadas se indican por encima del plásmido. La numeración comienza en el extremo 5' de la secuencia vírica. Se muestra la secuencia y la ubicación de la inserción del enlazador *SpeI*. B. La mutación Δ30 elimina los 31 nucleótidos indicados de la secuencia de 3'-UTR para crear p3Δ30.

30 Figura 9. A. Se construyeron virus del dengue quiméricos recombinantes introduciendo o bien las regiones CME o bien las ME de DEN2 (Tonga/74) en el fondo genético de DEN4. La ubicación relativa de la mutación Δ30 en la 3'-UTR se indica mediante una flecha y se indican las uniones intertípicas 1, 2 y 3. B. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las regiones de uniones intertípicas. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción usados en el ensamblaje de cada ADNc quimérico.

35 Figura 10. Cinética de crecimiento en células *Vero* de virus rDEN2/4Δ30 quiméricos que codifican para mutaciones de adaptación a células *Vero* individuales o combinadas. Se infectaron células *Vero* con los virus indicados a una MOI de 0,01. En los puntos de tiempo tras la infección indicados, se extrajeron muestras de 1 ml de medio de cultivo tisular, se aclararon mediante centrifugación y se congelaron a -80 °C. Se sometió a ensayo el nivel de replicación del virus mediante titulación de placas en células C6/36. El límite inferior de la detección era de 0,7 log₁₀ UFP/ml. Los niveles de replicación en el día 4 tras la infección se indican mediante la línea discontinua.

45 Figura 11. A. Se construyeron virus del dengue quiméricos recombinantes introduciendo o bien las regiones CME o bien las ME de DEN3 (Sleman/78) en el fondo genético de DEN4. La ubicación relativa de la mutación Δ30 en la 3'-UTR se indica mediante una flecha y se indican las uniones intertípicas 1, 2 y 3. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción usados en el ensamblaje de cada ADNc quimérico. B. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las regiones de uniones intertípicas. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción usados en el ensamblaje de cada ADNc quimérico.

50 Figura 12. A. Se construyeron virus del dengue quiméricos recombinantes introduciendo o bien las regiones CME o bien las ME de DEN1 (Puerto Rico/94) en el fondo genético de DEN4. La ubicación relativa de la mutación Δ30 en la 3'-UTR se indica mediante una flecha y se indican las uniones intertípicas 1, 2 y 3. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción usados en el ensamblaje de cada ADNc quimérico. B. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las regiones de uniones intertípicas. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción usados en el ensamblaje de cada ADNc quimérico.

55

Breve descripción de las secuencias

| Serotipo | Descripción o número de acceso de GenBank |
|----------|---|
| DEN1 | U88535 |
| DEN2 | Tonga/74 |
| DEN3 | Sleman/78 |
| DEN4 | AF326825 |

Breve descripción de las SEQ ID NO

60

| Identificación | Figura, tabla o apéndice | SEQ ID NO. |
|---|--------------------------|--------------|
| Región TL2 de DEN1 | Figura 2 | 1 |
| Región TL2 de DEN2 | Figura 2 | 2 |
| Región TL2 de DEN3 | Figura 2 | 3 |
| Región TL2 de DEN 4 | Figura 2 | 4 |
| Región TL2 de DEN1Δ30 | Figura 2 | 5 |
| Región TL2 de DEN2Δ30 | Figura 2 | 6 |
| Región TL2 de DEN3Δ30 | Figura 2 | 7 |
| Región TL2 de DEN4Δ30 | Figura 2 | 8 |
| Región TL2 de p2 | Figura 6 | 9 |
| Región TL2 de p2Δ30 | Figura 6 | 10 |
| Región TL2 de p3 | Figura 8 | 11 |
| Región TL2 de p3Δ30 | Figura 8 | 12 |
| Enlazador Spe1 en p3 | Figura 8 | 13 |
| Unión 1 de rDEN2/4 | Figura 9 | 14-nt, 15-aa |
| Unión 2 de rDEN2/4 | Figura 9 | 16-nt, 17-aa |
| Unión 3 de rDEN2/4 | Figura 9 | 18-nt, 19-aa |
| Unión 1 de rDEN3/4 | Figura 11 | 20-nt, 21-aa |
| Unión 2 de rDEN3/4 | Figura 11 | 22-nt, 23-aa |
| Unión 3 de rDEN3/4 | Figura 11 | 24-nt, 25-aa |
| Unión 1 de rDEN1/4 | Figura 12 | 26-nt, 27-aa |
| Unión 2 de rDEN1/4 | Figura 12 | 28-nt, 29-aa |
| Unión 3 de rDEN1/4 | Figura 12 | 30-nt, 31-aa |
| Región NS4B seleccionada de D4 | Tabla 15 | 32-nt, 33-aa |
| Región NS4B seleccionada de D1 | Tabla 15 | 34-nt, 35-aa |
| Región NS4B seleccionada de D2 | Tabla 15 | 36-nt, 37-aa |
| Región NS4B seleccionada de D3 | Tabla 15 | 38-nt, 39-aa |
| CCACGGGCGCCGT | Tabla 26 | 40 |
| AAGGCCTGGA | Tabla 26 | 41 |
| TATCCCCGGGAC | Tabla 26 | 42 |
| AGAGCTCTCTC | Tabla 26 | 43 |
| GAATCTCCACCCGGA | Tabla 26 | 44 |
| CTGTCTGAATC | Tabla 26 | 45 |
| Plásmido p2 de ADNc de DEN2 (Tonga/74) | Apéndice 1 | 46-nt, 47-aa |
| Plásmido p3 de ADNc de DEN3 (Sleman/78) | Apéndice 2 | 48-nt, 49-aa |
| Región quimérica CME de DEN1 (Puerto Rico/94) | Apéndice 3 | 50-nt, 51-aa |
| Región quimérica ME de DEN1 (Puerto Rico/94) | Apéndice 4 | 52-nt, 53-aa |

Descripción detallada de la realización preferida

Introducción

5 En el presente documento, se usa un enfoque molecular para desarrollar una vacuna tetravalente contra el virus del dengue atenuado vivo genéticamente estable. Cada componente de la vacuna tetravalente, concretamente DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, debe estar atenuado, ser genéticamente estable e inmunogénico. Es necesaria una vacuna tetravalente para garantizar protección simultánea frente a cada uno de los cuatro virus del dengue, impidiendo de ese modo la posibilidad de desarrollar las enfermedades más graves fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue (FHD/SCD), que se producen en seres humanos durante la infección secundaria con un virus del dengue de tipo silvestre heterotípico. Puesto que los virus del dengue pueden experimentar recombinación genética en la naturaleza (Worobey, M. *et al.* 1999 PNAS USA 96:7352-7), la vacuna tetravalente debería ser genéticamente incapaz de experimentar un acontecimiento de recombinación entre sus cuatro componentes de virus que pudiese conducir a la generación de virus que carecen de mutaciones atenuantes. Los enfoques previos para desarrollar una vacuna tetravalente contra el virus del dengue se han basado en derivar independientemente cada uno de los cuatro componentes de virus a través de procedimientos mutagénicos separados, tales como pase en células de cultivo tisular derivadas de un hospedador heterólogo. Esta estrategia ha producido candidatos a vacuna atenuados (Bhamarapravati, N. y Sutee, Y. 2000 Vaccine 18:44-7). Sin embargo, es posible que pudiesen producirse en las vacunas intercambios génicos entre los cuatro componentes de estas vacunas tetravalentes derivadas independientemente, creando posiblemente un virus recombinante virulento. Se han generado polivirus virulentos derivados de recombinación en vacunas tras la administración de una vacuna trivalente contra poliovirus (Guillot, S. *et al.* 2000 J Virol 74:8434-43).

25 La presente divulgación también describe: (1) mejoras para el candidato a vacuna rDEN4Δ30 descrito anteriormente,

2) virus recombinantes rDEN1 Δ 30, rDEN3 Δ 30 y rDEN3 Δ 30 atenuados que contienen una delección de 30 nucleótidos (Δ 30) en una sección de la región no traducida en 3' (UTR) que es homóloga a aquella en el virus recombinante rDEN4 Δ 30, (3) un método para generar una vacuna tetravalente contra el virus del dengue compuesta por rDEN1 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30 y rDEN4 Δ 30, 4) virus quiméricos antigénicos atenuados, rDEN1/4 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30 y rDEN3/4 Δ 30, para los que se han reemplazado las regiones génicas CME, ME o E de rDEN4 Δ 30 por aquellas derivadas de DEN1, DEN2 o DEN3; como alternativa rDEN1/3 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30 y rDEN4/3 Δ 30 para los que se han reemplazado las regiones génicas CME, ME o E de rDEN3 Δ 30 por aquellas derivadas de DEN1, 2 o 4; como alternativa rDEN2/2 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30 y rDEN4/2 Δ 30 para los que se han reemplazado las regiones génicas CME, ME o E de rDEN2 Δ 30 por aquellas derivadas de DEN1, 3 o 4; y como alternativa rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30 y rDEN4/1 Δ 30 para los que se han reemplazado las regiones génicas CME, ME o E de rDEN1 Δ 30 por aquellas derivadas de DEN2, 3 o 4, y 5) un método para generar una vacuna tetravalente contra el virus del dengue compuesta por rDEN1/4 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30 y rDEN4 Δ 30, como alternativa rDEN2/3 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30 y rDEN3 Δ 30, como alternativa rDEN1/2 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30 y rDEN2 Δ 30, y como alternativa rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30 y rDEN1 Δ 30. Estas vacunas tetravalentes son únicas puesto que contienen una mutación atenuante compartida común que elimina la posibilidad de generar un virus de tipo silvestre virulento en una vacuna puesto que cada componente de la vacuna posee la misma mutación por delección atenuante Δ 30. Además, la vacuna tetravalente rDEN1 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4 Δ 30 es la primera en combinar la estabilidad de la mutación Δ 30 con una amplia antigenicidad. Puesto que la mutación por delección Δ 30 está en la 3'-UTR de cada virus, todas las proteínas de los cuatro virus componentes están disponibles para inducir una respuesta inmunitaria protectora. Por tanto, el método proporciona un mecanismo de atenuación que mantiene cada una de las proteínas de los virus DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 en un estado que conserva la capacidad completa de cada una de las proteínas de los cuatro virus para inducir respuestas inmunitarias humorales y celulares frente a todas las proteínas estructurales y no estructurales presentes en cada serotipo de virus del dengue.

Tal como se describió anteriormente, se diseñó por ingeniería genética el virus recombinante de DEN4, rDEN4 Δ 30 (denominado anteriormente 2A Δ 30), para que contuviese una delección de 30 nucleótidos en la 3'-UTR del genoma vírico (Durbin, A.P. *et al.* 2001 *Am J Trop Med Hyg* 65:405-13; Men, R. *et al.* 1996 *J Virol* 70:3930-7). La evaluación en monos rhesus mostró que el virus estaba significativamente atenuado en relación con el virus original de tipo silvestre, siendo todavía altamente inmunogénico y completamente protector. Además, un ensayo clínico de fase I con voluntarios humanos adultos mostró que el virus recombinante rDEN4 Δ 30 era seguro e inmunogénico de manera satisfactoria (Durbin, A.P. *et al.* 2001 *Am J Trop Med Hyg* 65:405-13). Para desarrollar una vacuna tetravalente que porta una mutación atenuante compartida en una región no traducida, los presentes inventores seleccionaron la mutación Δ 30 para atenuar virus del dengue de tipo silvestre de serotipos 1, 2 y 3 puesto que atenuaba virus DEN4 de tipo silvestre para monos rhesus y era segura en seres humanos (figura 1).

La mutación Δ 30 se describió y caracterizó por primera vez en el virus DEN4 (Men, R. *et al.* 1996 *J Virol* 70: 3930-7). En DEN4, la mutación consiste en la eliminación de 30 nucleótidos contiguos que comprenden los nucleótidos 10478 - 10507 de la 3'-UTR (figura 2A) que forman una estructura de tallo-bucle supuesta denominada TL2 (Proutski, V. *et al.* 1997 *Nucleic Acids Res* 25:1194-202). Entre los flavivirus, las porciones grandes de la UTR forman estructuras secundarias altamente conservadas (Hahn, C.S. *et al.* 1987 *J Mol Biol* 198:33-41; Proutski, V. *et al.* 1997 - *Nucleic Acids Res* 25:1194-202). Aunque los nucleótidos individuales no se conservan necesariamente en estas regiones, un apareamiento de bases adecuado conserva la estructura de tallo-bucle en cada serotipo, un hecho que no es fácilmente evidente cuando solo se considera la secuencia primaria (figura 2B, C).

45 Quimeras del dengue inmunogénicas y métodos para su preparación

En el presente documento se proporcionan quimeras del dengue inmunogénicas y métodos para preparar las quimeras del dengue. Las quimeras del dengue inmunogénicas son útiles, solas o en combinación en un vehículo farmacéuticamente aceptable, como composiciones inmunogénicas para minimizar, inhibir o inmunizar individuos y animales frente a la infección por virus del dengue.

Las quimeras de la divulgación comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para la inmunogenicidad de un virus del dengue de un serotipo y secuencias de nucleótidos adicionales seleccionadas de la estructura principal de un virus del dengue de un serotipo diferente. Estas quimeras pueden usarse para inducir una respuesta inmunogénica frente al virus del dengue.

En otro aspecto, la quimera preferida es una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica para al menos una proteína estructural de un virus del dengue de un primer serotipo, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para proteínas no estructurales de un virus del dengue de un segundo serotipo diferente del primero. En el ámbito de la invención, el virus del dengue del segundo serotipo es DEN4. En otro aspecto, la proteína estructural puede ser la proteína C de un virus del dengue del primer serotipo, la proteína prM de un virus del dengue del primer serotipo, la proteína E de un virus del dengue del primer serotipo, o cualquier combinación de las mismas.

El término "resto" se usa en el presente documento para referirse a un aminoácido (D o L) o un mimético de aminoácido que se incorpora en un péptido mediante un enlace amida. Como tal, el aminoácido puede ser un

aminoácido que se produce de manera natural o, a menos que se limite de otra forma, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural (es decir, miméticos de aminoácido). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones de la estructura principal del péptido bien conocidas por los expertos en la técnica.

5 Además, un experto en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales en la secuencia de aminoácidos, o en la secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos, que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (normalmente menos del 5%, más normalmente menos del 1%) en una secuencia codificada son variaciones modificadas de manera conservativa, en las que las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas de uno por otro:

- 15 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 20 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 25 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “quimera de virus”, “virus quimérico”, “quimera del dengue” y “virus del dengue quimérico” significan una construcción infecciosa que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para la inmunogenicidad de un virus del dengue de un serotipo y secuencias de nucleótidos adicionales derivadas de la estructura principal de un virus del dengue de un serotipo diferente.

Tal como se usa en el presente documento, “construcción infecciosa” indica un virus, una construcción vírica, una quimera vírica, un ácido nucleico derivado de un virus o cualquier porción del mismo, que puede usarse para infectar una célula.

Tal como se usa en el presente documento, “quimera de ácido nucleico” significa una construcción que comprende ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para la inmunogenicidad de un virus del dengue de un serotipo y secuencias de nucleótidos adicionales derivadas de la estructura principal de un virus del dengue de un serotipo diferente. En consecuencia, cualquier virus quimérico o quimera de virus va a reconocerse como ejemplo de una quimera de ácido nucleico.

Debe entenderse que las proteínas estructurales y no estructurales incluyen cualquier proteína que comprenda o cualquier gen que codifique para la secuencia de la proteína completa, un epítipo de la proteína, o cualquier fragmento que comprenda, por ejemplo, tres o más restos de aminoácido de las mismas.

45 **Quimeras del dengue**

El virus del dengue es un patógeno de flavivirus transmitido por mosquitos. El genoma del virus del dengue contiene una región no traducida en 5' (5'-UTR), seguida por una región que codifica para una proteína de la cápsida (C), seguida por una región que codifica para una proteína de premembrana/membrana (prM), seguida por una región que codifica para una proteína de la envoltura (E), seguida por la región que codifica para las proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) y finalmente una región no traducida en 3' (3'-UTR). Las proteínas estructurales víricas son C, prM y E, y las proteínas no estructurales son NS1-NS5. Las proteínas estructurales y no estructurales se traducen como una única poliproteína y se procesa por proteasas víricas y celulares.

Las quimeras del dengue de la divulgación son construcciones formadas fusionando genes de proteínas estructurales de un virus del dengue de un serotipo, por ejemplo DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4, con genes de proteínas no estructurales de un virus del dengue de un serotipo diferente, por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4.

Las quimeras del dengue atenuadas, inmunogénicas proporcionadas en el presente documento contienen uno o más de los genes de proteínas estructurales, o partes antigénicas de las mismas, del virus del dengue de un serotipo contra el cual va a conferirse inmunogenicidad, y los genes de proteínas no estructurales de un virus del dengue de un serotipo diferente.

La quimera de la divulgación contiene un genoma de virus del dengue de un serotipo como estructura principal, en el que el/los gen(es) de proteína(s) estructural(es) que codifica(n) para proteína(s) C, prM o E del genoma del dengue, o combinaciones de las mismas, se reemplaza(n) por el/los gen(es) de proteína(s) estructural(es) correspondiente(s) de un virus del dengue de un serotipo diferente frente al que va a protegerse. La quimera vírica resultante tiene las propiedades de atenuación, en virtud de estar quimerizada con un virus del dengue de otro serotipo, y tiene por tanto una virulencia reducida, aunque expresa epítomos antigénicos de los productos génicos estructurales y por tanto es inmunogénica.

Puede usarse el genoma de cualquier virus del dengue como estructura principal en las quimeras atenuadas descritas en el presente documento. La estructura principal puede contener mutaciones que contribuyen al fenotipo de atenuación del virus del dengue o que facilitan su replicación en el sustrato celular usado para su fabricación, por ejemplo, células *Vero*. Las mutaciones pueden ser en la secuencia de nucleótidos que codifica para proteínas no estructurales, la región no traducida en 5' o la región no traducida en 3'. La estructura principal también puede contener mutaciones adicionales para mantener la estabilidad del fenotipo de atenuación y para reducir la posibilidad de que la quimera o el virus atenuado pudiese revertir de nuevo al virus virulento de tipo silvestre. Por ejemplo, una primera mutación en la región no traducida en 3' y una segunda mutación en la región no traducida en 5' proporcionarán estabilidad adicional del fenotipo de atenuación, si se desea. En particular, una mutación que es una delección de 30 nucleótidos de la región no traducida en 3' del genoma de DEN4 entre los nucleótidos 10478-10507 da como resultado una atenuación del virus DEN4 (Men *et al.* 1996 *J. Virology* 70:3930-3933; Durbin *et al.* 2001 *Am J Trop Med* 65:405-413, 2001). Por tanto, puede usarse el genoma de cualquier virus del dengue tipo 4 que contenga una mutación de este tipo en este locus como estructura principal en las quimeras atenuadas descritas en el presente documento. Además, pueden usarse también otros genomas de virus del dengue que contengan una mutación por delección análoga en la región no traducida en 3' de los genomas de otros serotipos de virus del dengue como estructura principal.

Tales mutaciones pueden lograrse mediante mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica entenderán que los ensayos de selección de virulencia, tal como se describen en el presente documento y tal como se conocen bien en la técnica, pueden usarse para distinguir entre estructuras principales virulentas y atenuadas.

Construcción de quimeras del dengue

Pueden producirse las quimeras del virus del dengue descritas en el presente documento sustituyendo al menos uno de los genes de proteínas estructurales del virus del dengue de un serotipo frente al cual se desea inmunidad en una estructura principal de genoma de virus del dengue de un serotipo diferente, usando técnicas de ingeniería genética recombinante bien conocidas por los expertos en la técnica, concretamente, eliminando un gen del virus del dengue designado de un serotipo y reemplazándolo por el gen correspondiente deseado de un virus del dengue de un serotipo diferente. Como alternativa, usando las secuencias proporcionadas en GenBank, pueden sintetizarse las moléculas de ácido nucleico que codifican para las proteínas del dengue usando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos conocidas e insertarse en un vector apropiado. Por tanto, se produce un virus atenuado, inmunogénico usando técnicas de ingeniería genética recombinante conocidas por los expertos en la técnica.

Tal como se mencionó anteriormente, el gen que va a insertarse en la estructura principal codifica para una proteína estructural del dengue de un serotipo. Preferentemente, el gen del dengue de un serotipo diferente que puede insertarse es un gen que codifica para una proteína C, una proteína prM y/o una proteína E. La secuencia insertada en la estructura principal del virus del dengue puede codificar para las proteínas estructurales tanto prM como E del otro serotipo. La secuencia insertada en la estructura principal del virus del dengue puede codificar para las proteínas estructurales C, prM y E del otro serotipo. La estructura principal del virus del dengue es el genoma del virus DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4, o un genoma de virus del dengue atenuado de cualquiera de estos serotipos, e incluye el/los gen(es) sustituido(s) que codifica(n) para la(s) proteína(s) estructural(es) C, prM y/o E de un virus del dengue de un serotipo diferente, o el/los gen(es) sustituido(s) que codifica(n) para la(s) proteína(s) estructural(es) prM y/o E de un virus del dengue de un serotipo diferente.

Pueden evaluarse quimeras de ácido nucleico o virus quiméricos adecuados que contienen secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas estructurales del virus del dengue de cualquiera de los serotipos para determinar su utilidad como vacunas examinándolos para detectar marcadores fenotípicos de atenuación que indiquen una reducción en la virulencia con conservación de la inmunogenicidad. La antigenicidad y la inmunogenicidad pueden evaluarse usando la reactividad *in vitro* o *in vivo* con anticuerpos frente al dengue o suero inmunorreactivo usando procedimientos de examen rutinarios conocidos por los expertos en la técnica.

Vacunas contra el dengue

Los virus quiméricos preferidos y las quimeras de ácido nucleico proporcionan virus vivos, atenuados útiles como inmunógenos o vacunas. En una realización preferida, los virus presentan alta inmunogenicidad mientras que al mismo tiempo no producen efectos letales o patogénicos peligrosos.

Los virus quiméricos o las quimeras de ácido nucleico de la presente divulgación pueden comprender los genes estructurales de un virus del dengue de un serotipo en una estructura principal de virus del dengue de tipo silvestre o atenuado de un serotipo diferente. Por ejemplo, la quimera puede expresar los genes de proteínas estructurales de un virus del dengue de un serotipo en cualquiera de un virus del dengue o un acervo de virus del dengue atenuado de un serotipo diferente.

La estrategia descrita en el presente documento de usar un fondo genético que contiene regiones no estructurales de un genoma de virus del dengue de un serotipo y, mediante quimerización, las propiedades de atenuación, para expresar los genes de proteínas estructurales de un virus del dengue de un serotipo diferente ha conducido al desarrollo de candidatos a vacuna contra el dengue vivo, atenuado que expresan genes de proteínas estructurales de inmunogenicidad deseada. Por tanto, pueden diseñarse candidatos a vacuna para el control de patógenos del dengue.

Los virus usados en las quimeras descritas en el presente documento se cultivan normalmente usando técnicas conocidas en la técnica. Se realizan entonces titulaciones de las unidades formadoras de focos (UFF) o placas de virus y se cuentan las placas o UFF con el fin de evaluar la viabilidad, el título y las características fenotípicas de los virus cultivados en cultivo celular. Se mutagenizan virus de tipo silvestre para derivar materiales de partida de candidatos atenuados.

Se construyen clones infecciosos quiméricos a partir de diversos serotipos del dengue. Si se desea, también puede lograrse la clonación de fragmentos de ADNc específicos de virus. Los fragmentos de ADNc que contienen los genes de proteínas estructurales o proteínas no estructurales se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) a partir de ARN del dengue con diversos cebadores. Se clonan los fragmentos amplificados en los sitios de escisión de otros clones intermedios. Se secuencian entonces los clones del dengue intermedios, quiméricos para verificar la secuencia del ADNc insertado específico del dengue.

Pueden obtenerse plásmidos quiméricos de longitud de genoma completa contruidos insertando la región génica de proteínas estructurales o no estructurales de virus del dengue en vectores usando técnicas recombinantes bien conocidas por los expertos en la técnica.

Métodos de administración

Las quimeras víricas descritas en el presente documento se combinan individual o conjuntamente con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para su administración como inmunógeno o vacuna a seres humanos o animales. Las expresiones “excipiente farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable” se usan en el presente documento queriendo decir cualquier composición o compuesto incluyendo, pero sin limitarse a, agua o solución salina, un gel, ungüento, disolvente, diluyente, base de pomada fluida, liposoma, micela, micela gigante, y similares, que sea adecuado para su uso en contacto con tejido humano o animal vivo sin provocar respuestas fisiológicas adversas, y que no interaccione con los otros componentes de la composición de manera perjudicial.

Las formulaciones de vacuna o inmunogénicas pueden presentarse de manera conveniente en una forma de dosificación de unidad formadora de placas (UFP) o unidad formadora de focos (UFF) y prepararse usando técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de llevar a asociación el principio activo y el/los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan llevando a asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos líquidos. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de comprimidos, gránulos y polvos estériles comúnmente usados por un experto habitual en la técnica.

Formulaciones de dosificación unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad, o una fracción apropiada de las mismas, del componente administrado. Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes comúnmente usados por un experto habitual en la técnica.

La composición de vacuna o inmunogénica puede administrarse a través de diferentes vías, tales como oral o parenteral, incluyendo, pero sin limitarse a, bucal y sublingual, rectal, mediante aerosol, nasal, intramuscular, subcutánea, intradérmica y tópica. La composición puede administrarse en diferentes formas, incluyendo, pero sin limitarse a, disoluciones, emulsiones y suspensiones, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas y liposomas. Se espera que puedan requerirse desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 dosis por programa de inmunización. Las dosis iniciales pueden oscilar desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente

100.000 UFP o UFF, con un intervalo de dosificación preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 20.000 UFP o UFF, un intervalo de dosificación más preferido de desde aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 12.000 UFP o UFF y un intervalo de dosificación lo más preferido de aproximadamente 1000 a aproximadamente 4000 UFP o UFF. La dosificación de las inyecciones de refuerzo puede oscilar desde aproximadamente 100 hasta

5 aproximadamente 20.000 UFP o UFF, con un intervalo de dosificación preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 15.000, un intervalo de dosificación más preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 UFP o UFF y un intervalo de dosificación lo más preferido de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 UFP o UFF. Por ejemplo, el volumen de administración variará dependiendo de la vía de administración. El volumen de las inyecciones intramusculares puede oscilar desde aproximadamente 0,1 ml hasta 1,0 ml.

10 La composición puede almacenarse a temperaturas de desde aproximadamente -100°C hasta aproximadamente 4°C. La composición también puede almacenarse en un estado liofilizado a diferentes temperaturas incluyendo temperatura ambiente. La composición puede esterilizarse a través de medios convencionales conocidos por un experto habitual en la técnica. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, filtración. La composición también puede

15 combinarse con agentes bacteriostáticos para inhibir el crecimiento bacteriano.

Pautas de administración

20 La composición de vacuna o inmunogénica descrita en el presente documento puede administrarse a seres humanos, especialmente a individuos que viajan a regiones en las que está presente la infección por virus del dengue, y también a los habitantes de esas regiones. El momento óptimo para la administración de la composición es aproximadamente de uno a tres meses antes de la exposición inicial al virus del dengue. Sin embargo, la composición también puede administrarse tras la infección inicial para mejorar la evolución de la enfermedad, o tras la infección inicial para tratar la enfermedad.

Adyuvantes

25 Puede administrarse una variedad de adyuvantes conocidos por un experto habitual en la técnica conjuntamente con el virus quimérico en la composición de vacuna o inmunogénica de la presente invención. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: polímeros, copolímeros tales como copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, incluyendo copolímeros de bloque, polímero p 1005, adyuvante completo de Freund (para animales), adyuvante incompleto de Freund; monooleato de sorbitano, escualeno, adyuvante CRL-8300, alumbre, QS 21, muramil dipéptido, motivos de oligonucleótido CpG y combinaciones de motivos de oligonucleótido CpG, trehalosa, extractos bacterianos, incluyendo extractos micobacterianos, endotoxinas destoxificadas, lípidos de

30 membrana o combinaciones de los mismos.

Secuencias de ácido nucleico

35 Las secuencias de ácido nucleico de virus del dengue de un serotipo y virus del dengue de un serotipo diferente son útiles para diseñar cebadores y sondas de ácido nucleico para la detección de quimeras de virus del dengue en una muestra o espécimen con alta sensibilidad y especificidad. Pueden usarse sondas o cebadores correspondientes a virus del dengue para detectar la presencia de un virus de vacuna. El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos correspondientes son útiles como herramientas de laboratorio para estudiar los organismos y las enfermedades y para desarrollar terapias y tratamientos para las enfermedades.

40 Los cebadores y las sondas de ácido nucleico se hibridan selectivamente con moléculas de ácido nucleico que codifican para virus del dengue o secuencias complementarias de las mismas. Por "selectivo" o "selectivamente" quiere decirse una secuencia que no se hibrida con otros ácidos nucleicos para prevenir la detección adecuada de la secuencia del virus del dengue. Por tanto, en el diseño de los ácidos nucleicos hibridantes, la selectividad dependerá de los otros componentes presentes en la muestra. El ácido nucleico hibridante debe tener al menos el 70% de complementariedad con el segmento del ácido nucleico con el que se hibrida. Tal como se usa en el presente documento para describir ácidos nucleicos, la expresión "se hibrida selectivamente" excluye los ácidos nucleicos hibridantes aleatorios ocasionales, y por tanto tiene el mismo significado que "específicamente hibridante". Los

45 cebadores y las sondas de ácido nucleico selectivamente hibridantes descritos en el presente documento pueden tener al menos el 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% y 99% de complementariedad con el segmento de la secuencia con la que se hibridan, preferiblemente el 85% o más.

50 La presente descripción también contempla secuencias, sondas y cebadores que se hibridan selectivamente con el ácido nucleico codificante o la hebra complementaria, u opuesta, del ácido nucleico. Puede producirse hibridación específica con ácido nucleico con sustituciones o modificaciones minoritarias en el ácido nucleico, siempre que se mantenga una capacidad de hibridación especie-especie funcional. Por "sonda" o "cebador" quiere decirse secuencias de ácido nucleico que pueden usarse como sondas o cebadores para la hibridación selectiva con secuencias de ácido nucleico complementarias para su detección o amplificación, sondas o cebadores que pueden

55 variar en longitud desde aproximadamente 5 hasta 100 nucleótidos, o preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta 50 nucleótidos, o lo más preferiblemente de manera aproximada 18-24 nucleótidos. Se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos aislados que se hibridan selectivamente con los ácidos nucleicos específicos

de especie en condiciones rigurosas y deben tener al menos cinco nucleótidos complementarios a la secuencia de interés tal como se describe en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

5 Si se usan como cebadores, la composición puede incluir preferentemente al menos dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan con diferentes regiones de la molécula diana de modo que se amplifica una región deseada. Dependiendo de la longitud de la sonda o el cebador, la región diana puede oscilar entre el 70% bases complementarias y complementariedad completa y todavía hibridar en condiciones rigurosas. Por ejemplo, para el fin de detectar la presencia del virus del dengue, el grado de complementariedad entre el ácido nucleico hibridante
10 (sonda o cebador) y la secuencia con la que se hibrida es al menos suficiente para distinguir la hibridación con un ácido nucleico de otros organismos.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican para el virus del dengue pueden insertarse en un vector, tal como un plásmido, y expresarse de manera recombinante en un organismo vivo para producir polipéptidos y/o péptido de
15 virus del dengue recombinante.

Las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento incluyen una sonda de diagnóstico que sirve para notificar la detección de un amplicón de ADNc amplificado a partir del molde de ARN genómico vírico usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT/PCR), así como amplímeros directos
20 e inversos que se diseñan para amplificar el amplicón de ADNc. En ciertos casos, uno de los amplímeros se diseña para contener una mutación específica de virus de vacuna en el extremo 3' terminal del amplímero, lo que hace de manera eficaz que la prueba sea incluso más específica para la cepa de vacuna debido a la extensión del cebador en el sitio diana, y en consecuencia se producirá amplificación solo si el molde de ARN viral contiene esa mutación específica.

25 Se han desarrollado recientemente sistemas de detección de secuencias de ácido nucleico basados en PCR automatizada. Se usa ampliamente el ensayo TaqMan (Applied Biosystems). Una estrategia desarrollada más recientemente para pruebas genéticas de diagnóstico hace uso de balizas moleculares (Tyagi y Kramer, 1996 *Nature Biotechnology* 14:303-308). Los ensayos con balizas moleculares emplean colorantes indicadores y extintores que difieren de los usados en el ensayo TaqMan. Un experto en la técnica puede usar estos y otros sistemas de detección.
30

EJEMPLO COMPARATIVO 1

35 **Mejora del candidato a vacuna contra el virus del dengue rDEN4Δ30**

Se evaluó la seguridad del candidato a vacuna contra el dengue-4 atenuada viva recombinante, rDEN4Δ30, en veinte voluntarios humanos que recibieron una dosis de 5,0 log₁₀ unidades formadoras de placas (UFP) (Durbin A.P. *et al.* 2001 *Am J Trop Med Hyg* 65:405-413). Se descubrió que el candidato a vacuna era seguro, se toleraba bien y era inmunogénico en todas las vacunas. Sin embargo, cinco de los vacunados experimentaron una elevación transitoria en los niveles de alanina aminotransferasa, tres experimentaron neutropenia y diez vacunados desarrollaron un exantema macular asintomático, lo que sugiere que puede ser necesario atenuar adicionalmente este candidato a vacuna.
40

45 Actualmente, está realizándose un estudio de disminución a escala de la dosis, controlado por placebo, de doble enmascaramiento, aleatorizado para determinar la dosis infecciosa humana 50 (DIH₅₀) de rDEN4Δ30. Cada cohorte de dosis consiste en aproximadamente veinte vacunados y cuatro receptores de placebo. Hasta la fecha, se han recogido datos completos para dosis de 3,0 log₁₀ UFP y 2,0 log₁₀ UFP. rDEN4Δ30 infectaba al 100% de los vacunados cuando se administraron 3,0 log₁₀ UFP y al 95% de los vacunados cuando se administraron 2,0 log₁₀ UFP (tabla 1). El candidato a vacuna provocó enfermedad no sintomática a cualquier dosis (tabla 1). Un vacunado que recibió 3,0 log₁₀ UFP experimentó una elevación transitoria en los niveles de alanina aminotransferasa y aproximadamente un cuarto de los vacunados experimentaron neutropenia a ambas dosis (tabla 1). La neutropenia fue transitoria y leve. Más de la mitad de los vacunados desarrollaron un exantema macular a ambas dosis; la aparición del exantema no estaba correlacionada con la dosis de vacunación ni con la viremia (tabla 1 y tabla 2). Ni el título pico ni la aparición de la viremia difirieron entre las dosis de 3,0 log₁₀ UFP y 2,0 log₁₀ UFP, aunque ambas medidas de viremia eran significativamente inferiores para estas dosis que para una dosis de 5,0 log₁₀ UFP (tabla 3). El candidato a vacuna era inmunogénico en el 95% de los vacunados a ambas dosis y los anticuerpos neutralizantes no disminuyeron entre los días 28 y 42 tras la vacunación (tabla 4). Aunque no se ha determinado todavía la DIH₅₀, es claramente inferior a 2,0 log₁₀ UFP. De manera interesante, las disminuciones en la dosis de vacuna no han
50 tenido ningún efecto sistemático sobre la inmunogenicidad, viremia, neutropenia benigna o la aparición de exantema. Por tanto, no será posible necesariamente atenuar adicionalmente rDEN4Δ30 disminuyendo la dosis de virus administrada, y deben desarrollarse otros enfoques.
60

Tabla 1. Resumen clínico de rDEN4Δ30

| N.º de | Dosis ^a | N.º de | N.º con | Título | N.º de voluntarios con: |
|--------|--------------------|--------|---------|--------|-------------------------|
|--------|--------------------|--------|---------|--------|-------------------------|

| sujetos | | infectados | viremia | pico medio ^b | Fiebre | Exantema | Neutropenia ^c | ↑ALT |
|---------|-----|------------|---------|-------------------------|----------------|----------|--------------------------|----------------|
| 20 | 5,0 | 20 | 14 | 1,2 (0,2) | 1 ^d | 10 | 3 | 5 |
| 20 | 3,0 | 20 | 7 | 0,4 (0,0) | 0 | 11 | 5 | 1 ^e |
| 20 | 2,0 | 19 | 11 | 0,6 (0,1) | 1 ^d | 16 | 4 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^aLog₁₀ ufp

^bLog₁₀ ufp/ml

^cNeutropenia definida como ANC < 1500/dl

^dT máxima en voluntarios = 100,4°F

^eALT día 0 = 78, ALT máxima = 91 (día 14)

Tabla 2. Patrón de exantema en vacunados

| Dosis ^a | N.º con viremia | N.º con exantema | Viremia y exantema | Viremia sin exantema | Día medio de aparición ± DE | Duración media (días ± DE) |
|--------------------|-----------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 5 | 14/20 | 10/20 | 9/20 | 5/20 | 8,1 ± 1,3 [A] ^a | 3,6 ± 2,0 [A] |
| 3 | 7/20 | 11/20 | 6/20 | 1/20 | 12,2 ± 1,4 [B] | 5,0 ± 2,1 [A] |
| 2 | 11/20 | 16/20 | 9/20 | 2/20 | 11,2 ± 1,4 [B] | 6,9 ± 1,7 [B] |

^alog₁₀ ufp

^bLas medias en cada columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$)

Tabla 3. Resumen de viremia de rDEN4Δ30

| Dosis ^a | N.º con viremia | Título pico medio (log ₁₀ ufp/ml) | Aparición media de la viremia (día ± DE) | Duración media de la viremia (día ± DE) |
|--------------------|-----------------|--|--|---|
| 5 | 14 | 1,2 ± 0,2 [A] | 5,8 ± 2,4 [A] ^b | 4,4 ± 2,4 [A] |
| 3 | 7 | 0,4 ± 0,0 [B] | 9,1 ± 2,5 [B] | 1,6 ± 1,0 [B] |
| 2 | 11 | 0,6 ± 0,1 [B] | 8,7 ± 2,4 [B] | 2,6 ± 2,0 [A] |

^alog₁₀ ufp

^bLas medias en cada columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$)

5

Tabla 4. Inmunogenicidad de rDEN4Δ30

| N.º de sujetos | Dosis (log ₁₀) | N.º de infectados | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (intervalo) | | % de seroconversión |
|----------------|----------------------------|-------------------|--|--------------------|---------------------|
| | | | Día 28 | Día 42 | |
| 20 | 5,0 | 20 | 567 (72 - 2455) | 399 (45 - 1230) | 100 |
| 20 | 3,0 | 20 | 156 (5 - 2365) | 158 (25 - 1222) | 95 |
| 20 | 2,0 | 19 | 163 (5 - 943) | 165 (5 - 764) | 95 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Se han utilizado dos enfoques para atenuar adicionalmente rDEN4Δ30. El primero es la generación y caracterización de mutaciones puntuales atenuantes en rDEN4 usando mutagénesis con 5'-fluorouracilo (Blaney, J.E. Jr. *et al.* 2002 Virology 300: 125-139; Blaney, J.E. Jr. *et al.* 2001 J. Virol. 75: 9731-9740). Este enfoque ha identificado un panel de mutaciones puntuales que confieren una gama de fenotipos de sensibilidad a la temperatura (*ts*) y placas pequeñas (*sp*) en células Vero y HuH-7 y fenotipos de atenuación (*att*) en cerebro de ratón lactante y ratones SCID con injerto de células HuH-7 (ratones SCID-HuH-7). En este ejemplo, se ha introducido un subconjunto de estas mutaciones en rDEN4Δ30 y se han evaluado los fenotipos de los virus resultantes.

10

15

Un segundo enfoque fue crear una serie de mutaciones de carga a alanina apareadas en pares contiguos de restos de aminoácido con carga en el gen NS5 de rDEN4. Tal como se demostró previamente, una mutación de 32 pares

contiguos individuales de restos de aminoácido con carga en NS5 de rDEN4 confería una gama de fenotipos *ts* en células Vero y HuH-7 y una gama de fenotipos *att* en cerebro de ratón lactante (Hanley, K.H. *et al.* 2002 J. Virol. 76 525-531). Tal como se demuestra a continuación, estas mutaciones también confieren un fenotipo *att* en ratones SCID-HuH-7. Estas mutaciones se han introducido, o bien como pares individuales o bien como conjuntos de dos pares, en rDEN4 Δ 30 para determinar si son compatibles con la mutación Δ 30 y si potencian los fenotipos *att* de rDEN4 Δ 30.

Se ha caracterizado un panel de virus rDEN4 que portan mutaciones puntuales individuales que poseen fenotipos sensibles a la temperatura y/o de placas pequeñas en cultivo tisular y niveles variables de replicación atenuada en cerebro de ratón lactante en comparación con virus rDEN4 de tipo silvestre (Blaney, J. E. *et al.* 2002 Virology 300:125-139; Blaney, J. E. *et al.* 2001 J Virol. 75:9731-9740). Se han seleccionado tres mutaciones para combinarse con la mutación por delección Δ 30 para evaluar su capacidad para restringir adicionalmente la replicación de rDEN4 Δ 30 en monos rhesus. En primer lugar, se combinó previamente la mutación de cambio de sentido en NS3 en el nucleótido 4995 (Ser > Pro) que confiere sensibilidad a la temperatura en células Vero y HuH-7 y replicación restringida en cerebro de ratón lactante con la mutación Δ 30 (Blaney, J. E. *et al.* 2001 J Virol. 75:9731-9740). Se descubrió que el virus resultante, rDEN4 Δ 30-4995, estaba más restringido (1.000 veces) en la replicación en cerebro de ratón que el virus rDEN4 Δ 30 (<5 veces) en comparación con el virus rDEN4 de tipo silvestre. En segundo lugar, se combinó una mutación de cambio de sentido en el nucleótido 8092 (Glu > Gly) que también confiere sensibilidad a la temperatura en células Vero y HuH-7 y replicación restringida 10.000 veces en cerebro de ratón lactante con la mutación Δ 30 en este caso. En tercer lugar, se combinó una sustitución en la 3'-UTR en el nucleótido 10634 que confiere sensibilidad a la temperatura en células Vero y HuH-7, tamaño de placas pequeño en células HuH-7 y replicación restringida aproximadamente 1.000 veces en cerebro de ratón lactante y ratones SCID con trasplante de células HuH-7, con la mutación Δ 30 en este caso (Blaney, J. E. *et al.* 2002 Virology 300:125-139).

Para la presente investigación, se introdujeron fragmentos subclonados de p4 (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65: 405-13) que contenían las mutaciones anteriores en el clon de ADNc p4 Δ 30. Para la transcripción y recuperación de virus, se linealizó el ADNc con *Acc65I* (isoesquizómero de *KpnI* que se escinde dejando solo un único nucleótido en 3') y se usó como molde para la transcripción mediante ARN polimerasa SP6 tal como se describió anteriormente (Blaney, J. E. *et al.* 2002 Virology 300:125-139). Se transfectaron células de mosquito C6/36 usando transfección mediada por liposomas y se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular entre los días cinco y siete. Se diluyó de manera terminal dos veces en células Vero el virus recuperado y se pasó dos (rDEN4 Δ 30-4995) o tres (rDEN4 Δ 30-8092 y rDEN4 Δ 30-10634) veces en células Vero.

Se determinaron las secuencias genómicas completas de los virus rDEN4 Δ 30-4995, rDEN4 Δ 30-8092 y rDEN4 Δ 30-10634 tal como se describió anteriormente (Durbin *et al.* 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413). Tal como se esperaba, cada derivado de virus rDEN4 Δ 30 contenía la mutación Δ 30. De manera inesperada, en el virus rDEN4 Δ 30-4995, los cambios de nucleótidos en el codón que contenía el nucleótido 4995 dieron como resultado un cambio de aminoácido Ser > Leu en vez de un cambio Ser > Pro puesto que se diseñó el ADNc de p4 Δ 30-4995 para introducir el cambio Ser > Pro (tabla 5). De hecho, se descubrió que el clon de ADNc de p4 Δ 30-4995 codificaba para un cambio Ser > Pro en el nucleótido 4995, de modo que no está claro cómo la población de virus adquirió la mutación Ser > Leu. No obstante, se evaluó este virus para valorar el genotipo especificado por esta mutación de cambio de sentido. También se descubrió que el virus rDEN4 Δ 30-4995 contenía una mutación incidental en los nucleótidos 4725-6 que dio como resultado un cambio en un único aminoácido (Ser > Asp). Los virus rDEN4 Δ 30-8092 y rDEN4 Δ 30-10634 contenían las sustituciones de nucleótidos apropiadas así como mutaciones imprevistas adicionales en E, NS4B y NS4B, respectivamente (tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones de UTR y de cambio de sentido presentes en derivados de virus rDEN4 Δ 30 que portan mutaciones puntuales introducidas

| Virus | Gen | Posición de nucleótido | Sustitución de nucleótidos | Posición de aminoácido ^a | Cambio de aminoácidos |
|-------------------------|------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| rDEN4 Δ 30-4995 | NS3 | 4725 | U > G | 1542 | Ser > Asp |
| | NS3 | 4726 | C > A | 1542 | Ser > Asp |
| | NS3 | 4995 ^b | U > C | 1632 | Ser > Leu |
| rDEN4 Δ 30-8092 | E | 1612 | A > C | 504 | Asp > Ala |
| | NS4B | 7131 | A > G | 2344 | Thr > Ala |
| | NS5 | 8092 ^b | A > G | 2664 | Glu > Gly |
| rDEN4 Δ 30-10634 | NS4B | 6969 | A > U | 2290 | Met > Leu |
| | NS4B | 7182 | G > C | 2361 | Gly > Arg |

| Virus | Gen | Posición de nucleótido | Sustitución de nucleótidos | Posición de aminoácido ^a | Cambio de aminoácidos |
|-------|--------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | 3'-UTR | 10634 ^b | U > C | ninguna | ninguno |

^a Posición de aminoácido en la poliproteína de DEN4 que comienza con el resto de metionina de la proteína C (nucleótidos 102-104) como posición 1.

^b La mutación restringe la replicación en modelos de ratón de infección por DEN4 que se introdujeron por mutagénesis Kunkel.

- La replicación de los tres virus rDEN4Δ30 modificados se comparó con los virus rDEN4Δ30 y rDEN4 de tipo natural en el modelo de cerebro de ratón lactante y ratones SCID con trasplante de células HuH-7 (ratones SCID-HuH-7). Se realizaron los experimentos tal como se describió anteriormente (Blaney, J. E. *et al.* 2002 *Virology* 300:125-139; Blaney, J. E. *et al.* 2001 *J Virol.* 75: 9731-9740). En resumen, para la infección de cerebro de ratón lactante, se inocularon a grupos de ratones de seis-siete días de edad por vía intracerebral 4,0 log₁₀ UFP de virus y se extrajo el cerebro de cada ratón cinco días después. Entonces se congelaron los sobrenadantes aclarados de suspensiones de cerebro al 10% a -70 °C, y se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero. Para el análisis de la replicación del virus DEN4 en ratones SCID-HuH-7, se inyectaron por vía intraperitoneal a ratones SCID de cuatro a seis semanas de edad 10⁷ células HuH-7. De cinco a seis semanas tras el trasplante, se infectaron los ratones mediante inoculación directa en el tumor de 4,0 log₁₀ UFP de virus, y se obtuvo suero para la titulación del virus mediante punción en la cola en el día 7. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.
- El virus rDEN4 de tipo silvestre se replicó a 6,0 log₁₀ UFP/g en cerebro de ratón lactante, y rDEN4Δ30 estaba restringido en su replicación en 0,7 log₁₀ UFP/g, lo que es similar a las observaciones previas (tabla 6) (Blaney, J. E. *et al.* 2001 *J Virol.* 75: 9731-9740). Se descubrió que los virus rDEN4Δ30-4995, rDEN4Δ30-8092 y rDEN4Δ30-10634 tenían una replicación restringida en cerebro de ratón lactante en comparación con el virus rDEN4 de 3,3, 2,8 y 2,4 log₁₀ UFP/g, respectivamente. Estos resultados indican que las mutaciones atenuantes adicionales sirven para restringir adicionalmente la replicación del virus rDEN4Δ30 en cerebro de ratón oscilando desde 50 veces (rDEN4Δ30-10634) hasta 400 veces (rDEN4Δ30-4995). En ratones SCID-HuH-7, el título de virus del virus rDEN4Δ30 era 0,4 log₁₀ UFP/ml inferior al virus rDEN4, lo que también es similar a los estudios previos (Blaney, J. E. *et al.* 2002 *Virology* 300:125-139). Se encontró que cada virus rDEN4Δ30 modificado estaba restringido adicionalmente en su replicación en ratones SCID-HuH-7 (tabla 6). Los virus rDEN4Δ30-4995, rDEN4Δ30-8092 y rDEN4Δ30-1063 tenían replicación restringida en ratones SCID-HuH-7 en comparación con el virus rDEN4 de 2,9, 1,1 y 2,3 log₁₀ UFP/g por debajo del nivel del virus rDEN4 de tipo silvestre, respectivamente. Se hicieron dos importantes observaciones: (1) las mutaciones 4995, 8092 y 10634 eran compatibles para su viabilidad con la mutación Δ30, y (2) estos tres virus rDEN4Δ30 modificados tenían una reducción de entre 10 y 1.000 veces en la replicación en comparación con el virus rDEN4 de tipo natural, lo que permite que virus con un intervalo amplio de atenuación en este modelo se evalúen adicionalmente en monos o seres humanos.

Tabla 6. La adición de mutaciones puntuales en NS3, NS5 o la 3'-UTR al virus rDEN4Δ30 atenúa adicionalmente el virus para cerebro de ratón lactante y ratones SCID-HuH-7

| Virus | Replicación en cerebro de ratón lactante ^a | | | Replicación en ratones SCID-HuH-7 ^c | | |
|----------------|---|---|---|--|---|---|
| | N.º de ratones | Título de virus ± EE log ₁₀ UFP/g de cerebro | Reducción de unidades log ₁₀ media con respecto al tipo natural ^b | N.º de ratones | Título de virus ± EE log ₁₀ UFP/g de suero | Reducción de unidades log ₁₀ media con respecto al tipo natural ^b |
| rDEN4 | 12 | 6,0 ± 0,1 | - | 13 | 6,4 ± 0,2 | - |
| rDEN4Δ30 | 12 | 5,3 ± 0,1 | 0,7 | 20 | 6,0 ± 0,2 | 0,4 |
| rDEN4Δ30-4995 | 6 | 2,7 ± 0,4 | 3,3 | 5 | 3,5 ± 0,3 | 2,9 |
| rDEN4Δ30-8092 | 6 | 3,2 ± 0,2 | 2,8 | 7 | 5,0 ± 0,4 | 1,1 |
| rDEN4Δ30-10634 | 12 | 3,6 ± 0,1 | 2,4 | 5 | 4,4 ± 0,3 | 2,3 |

^a Se inocularon a grupos de 6 ratones lactantes por vía i.c. 10⁴ UFP de virus. Se extrajeron los cerebros 5 días después, se homogeneizaron y se titularon en células Vero.

^b Comparación de los títulos de virus medios de ratones inoculados con virus mutante y control de tipo natural de rDEN4 simultáneo.

^c Se inocularon a grupos de ratones HuH-7-SCID directamente en el tumor 10⁴ UFP de virus. Se recogió suero en el día 6 y 7 y se tituló en células Vero.

Basándose en los hallazgos en los dos modelos de ratón de infección por virus DEN4, se evaluó cada uno de los virus rDEN4Δ30-4995, rDEN4Δ30-8092 y rDEN4Δ30-10634 en el modelo de macaco rhesus de infección por DEN4 que se ha descrito anteriormente (Durbin *et al.* 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413). En resumen, se inocularon a grupos de cuatro (rDEN4Δ30-4995, rDEN4Δ30-8092 y rDEN4Δ30-10634) o dos (rDEN4, rDEN4Δ30, simulado) monos con 5,0 log₁₀ UFP de virus por vía subcutánea. Se observaron diariamente los monos y se recogió suero en los días de 0 a 6, 8, 10 y 12, y se determinaron los títulos de virus mediante ensayo de placas en células Vero para la medición de la viremia. En el día 28, se extrajo suero y se sometió a prueba el nivel de anticuerpos neutralizantes mediante ensayo de reducción de placas en células Vero tal como se describió anteriormente (Durbin *et al.* 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413).

Se detectó la viremia comenzando en el día 1 tras la infección y terminando en el día 4 en todos los monos (tabla 7, figura 3). La viremia estaba presente en cada mono infectado con los virus rDEN4, rDEN4Δ30 o rDEN4Δ30-10634, pero solo 2 de 4 monos infectados con los virus rDEN4Δ30-4995 o rDEN4Δ30-8092 tenían viremia detectable. Tal como se esperaba, la infección con virus rDEN4 dio como resultado el mayor número medio de días virémicos por mono (3,0 días) así como título de virus pico medio (2,2 log₁₀ UFP/ml). Los monos infectados con el virus rDEN4Δ30 tenían tanto un número medio inferior de días virémicos por mono (2,0 días) como título de virus pico medio (1,1 log₁₀ UFP/ml) en comparación con el virus rDEN4. Grupos de monos infectados con cada uno de los virus rDEN4Δ30 modificados tenían un número medio adicionalmente restringido de días virémicos, teniendo los inoculados con el virus rDEN4Δ30-8092 el menor valor, 0,5 días, una reducción de 4 veces en comparación con el virus rDEN4Δ30. El título de virus pico medio de monos infectados con rDEN4Δ30-4995 (0,9 log₁₀ UFP/ml) o rDEN4Δ30-8092 (0,7 log₁₀ UFP/ml) también era inferior al de los infectados con el virus rDEN4Δ30. Sin embargo, el título de virus pico medio de monos infectados con rDEN4Δ30-10634 (1,3 log₁₀ UFP/ml) era ligeramente superior al de los infectados con rDEN4Δ30 particularmente en el día 2 (figura 3).

Tabla 7. La adición de mutaciones puntuales a rDEN4Δ30 atenúa adicionalmente el virus para monos Rhesus

| Virus ^a | N.º de monos | N.º de monos con viremia | N.º medio de días virémicos por mono ^b | Título de virus pico medio (log ₁₀ UFP/ml ± EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|--------------------|--------------|--------------------------|---|--|---|--------|
| | | | | | Día 0 | Día 28 |
| Simulado | 2 | 0 | 0 | <0,7 | <10 | <10 |
| rDEN4 | 2 | 2 | 3,0 | 2,2 ± 0,6 | <10 | 398 |
| rDEN4Δ30 | 2 | 2 | 2,0 | 1,1 ± 0,4 | <10 | 181 |
| rDEN4Δ30-4995 | 4 | 2 | 0,8 | 0,9 ± 0,2 | <10 | 78 |
| rDEN4Δ30-8092 | 4 | 2 | 0,5 | 0,7 ± 0,1 | <10 | 61 |
| rDEN4Δ30-10634 | 4 | 4 | 1,3 | 1,3 ± 0,2 | <10 | 107 |

^a Se inocularon por vía subcutánea a grupos de monos rhesus con 10⁵ UFP de los virus indicados en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días de 0 a 6, 8, 10, 12 y 28. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

^b No se detectó viremia en ningún mono tras el día 4.

Se sometió a prueba el suero recogido en el día 0 y 28 para determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes contra rDEN4. No se encontró ningún anticuerpo neutralizante detectable contra DEN4 en el día 0, tal como se esperaba, puesto que los monos se seleccionaron previamente para que fuesen negativos para anticuerpos neutralizantes contra flavivirus (tabla 7). En el día 28, los monos infectados con rDEN4 tenían un título de anticuerpos neutralizantes séricos medio (dilución recíproca) de 398 que era aproximadamente dos veces superior al de monos infectados con el virus rDEN4Δ30 (1:181). Este resultado y el nivel de viremia dos veces superior en monos infectados con el virus rDEN4 son similares a los resultados obtenidos anteriormente (Durbin *et al.* 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413). Los monos infectados con los virus rDEN4Δ30-4995 (1:78), rDEN4Δ30-8092 (1:61) y rDEN4Δ30-10634 (1:107) tenían cada uno un título de anticuerpos neutralizantes séricos medio reducido en comparación con monos infectados con el virus rDEN4Δ30. Los cuatro monos que no tenían viremia detectable tenían títulos de anticuerpos neutralizantes séricos que indicaban que estaban de hecho infectados. A pesar del ligero aumento en el título de virus de pico medio del virus rDEN4Δ30-10634 en comparación con el virus rDEN4Δ30, el virus rDEN4Δ30-10634 tenía un título de anticuerpos neutralizantes séricos medio inferior en comparación con monos infectados con el virus rDEN4Δ30. Esto y el número medio inferior de días virémicos por mono sugieren que la mutación 10634 puede atenuar la replicación del virus rDEN4Δ30 en monos.

En el día 28 tras la inoculación, se expusieron todos los monos a $5,0 \log_{10}$ UFP de virus rDEN4 de tipo silvestre por vía subcutánea. Se observaron los monos diariamente y se recogió suero en los días de 28 a 34, 36 y 38, y se determinaron los títulos de virus mediante ensayo de placas en células Vero para la medición de la viremia tras la exposición. Veintiocho días tras la exposición al virus rDEN4, se extrajo suero y se sometió a prueba el nivel de anticuerpos neutralizantes mediante ensayo de reducción de placas en células Vero. Los monos inoculados de manera simulada tenían un título de virus de pico medio de $2,3 \log_{10}$ UFP/ml tras la exposición con un número medio de días virémicos de 3,5 (tabla 8). Sin embargo, los monos inoculados con rDEN4, rDEN4 Δ 30 o cada uno de los virus rDEN4 Δ 30 modificados no tenían viremia detectable, lo que indica que a pesar de la disminución en la replicación e inmunogenicidad de los virus rDEN4 Δ 30-4995, rDEN4 Δ 30-8092 y rDEN4 Δ 30-10634, cada uno era suficientemente inmunogénico para inducir protección frente a rDEN4 de tipo silvestre. Los aumentos en el título de anticuerpos neutralizantes medio eran mínimos (< 3 veces) tras la exposición en todos los grupos de inoculación excepto para el infectado de manera simulada, lo que proporciona pruebas adicionales de que los monos estaban protegidos frente a la exposición.

15 **Tabla 8.** rDEN4 Δ 30 que contiene mutaciones puntuales adicionales protege a monos rhesus frente a la exposición al virus DEN4 de tipo natural

| Virus ^a | N.º de monos | N.º medio de días virémicos por mono tras la exposición a rDEN4 | Título de virus pico medio (\log_{10} UFP/ml \pm EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|-------------------------|--------------|---|---|---|--------|
| | | | | Día 28 | Día 56 |
| Simulado | 2 | 3,5 | $2,3 \pm 0,1$ | <10 | 358 |
| rDEN4 | 2 | 0,0 | $<0,7$ | 398 | 753 |
| rDEN4 Δ 30 | 2 | 0,0 | $<0,7$ | 181 | 202 |
| rDEN4 Δ 30-4995 | 4 | 0,0 | $<0,7$ | 78 | 170 |
| rDEN4 Δ 30-8092 | 4 | 0,0 | $<0,7$ | 61 | 131 |
| rDEN4 Δ 30-10634 | 4 | 0,0 | $<0,7$ | 107 | 177 |

^a 28 días tras la inoculación primaria con los virus indicados, se expusieron monos rhesus por vía subcutánea a 10^5 UFP de virus rDEN4 en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días de 28 a 34, 36, 38 y 56. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero

En conjunto, estos resultados indican que las tres mutaciones puntuales (4995, 8092 y 10634) descritas anteriormente atenúan adicionalmente el candidato a vacuna rDEN4 Δ 30 en cerebro de ratón lactante, en ratones SCID-HuH-7 y en monos rhesus. Debido a las mutaciones imprevistas adicionales (tabla 4) presentes en cada virus rDEN4 Δ 30 modificado, los fenotipos no pueden atribuirse directamente a las mutaciones puntuales 4995, 8092 y 10634 individuales. Sin embargo, la presencia de fenotipos de atenuación en ratones similares en otros virus rDEN4 que portan una de estas tres mutaciones apoya la opinión de que las mutaciones puntuales 4995, 8092 y 10634 son responsables de los fenotipos *att* en los virus rDEN4 Δ 30 modificados. Puesto que los virus rDEN4 Δ 30-4995, rDEN4 Δ 30-8092 y rDEN4 Δ 30-10634 demostraron una disminución en su replicación en monos rhesus mientras que conservaban una inmunogenicidad suficiente para conferir inmunidad protectora, se contemplan estos virus como vacunas contra el dengue para seres humanos.

Se generaron a continuación virus DEN4 que portaban mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina. Se identificó un subconjunto de siete grupos de mutaciones de carga a alanina descritas anteriormente que conferían una disminución de entre 10 veces y 1.000 veces en la replicación en ratones SCID-HuH-7 y cuya secuencia no mutada estaba bien conservada en los cuatro serotipos del dengue. Se introdujeron estas mutaciones como pares individuales y como dos conjuntos de pares en rDEN4 Δ 30 usando técnicas de clonación convencionales. Se realizó la transcripción y la recuperación de virus y la dilución terminal de virus tal como se describió anteriormente. El ensayo del nivel de sensibilidad a la temperatura de los virus mutantes de carga-grupo a alanina en células Vero y HuH-7, el nivel de replicación en el cerebro de ratones lactantes y el nivel de replicación en ratones SCID-HuH-7 se realizó tal como se describió anteriormente.

La introducción de un par de mutaciones de carga a alanina en rDEN4 produjo virus recuperable en todos los casos (tabla 9). La introducción de dos pares de mutaciones de carga a alanina produjo virus recuperable en dos de tres casos (no era recuperable rDEN4 Δ 30-436-437-808-809).

rDEN4 Δ 30 no es *ts* en células Vero o HuH-7. En cambio, siete de los siete conjuntos de mutaciones de carga a alanina usados en este ejemplo conferían un fenotipo *ts* en células HuH-7 y cinco conferían también un fenotipo *ts* en células Vero. Los seis virus que portaban mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina mostraron un fenotipo *ts* tanto en células Vero como HuH-7 (tabla 9). rDEN4 Δ 30 no está atenuado en cerebro de ratón lactante, mientras que
5 cinco de los siete conjuntos de mutaciones de carga a alanina conferían un fenotipo *att* en cerebro de ratón lactante (tabla 10). Cuatro de los virus que portaban mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina estaban atenuados en cerebro de ratón lactante (tabla 10). En un caso (rDEN4 Δ 30-23-24-396-397), la combinación de dos mutaciones que no producían atenuación solas dio como resultado un virus atenuado. Generalmente, los virus que portaban mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina mostraron niveles de replicación en el cerebro de ratón lactante más
10 similares a su virus original mutante de carga a alanina que a rDEN4 Δ 30.

rDEN4 Δ 30 está atenuado en ratones SCID-HuH-7, como lo están seis de los siete virus mutantes de carga a alanina usados en este ejemplo. Los virus que portaban mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina tendían a mostrar niveles similares o ligeramente inferiores de replicación en ratones SCID-HuH-7 en comparación con su virus original mutante de carga a alanina (tabla 10). En tres casos, los virus que portaban mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina mostraron al menos una reducción cinco veces mayor en ratones SCID-HuH-7 que rDEN4 Δ 30.
15

Se determinó la secuencia genómica completa de cinco virus (rDEN4-200-201, rDEN4 Δ 30-200-201, rDEN4-436-437 [clon 1], rDEN4 Δ 30-436-437 y rDEN4-23-24-200-201) que se replicaban a $> 10^5$ UFP/ml en células Vero a 35°C y que mostraban una reducción de cien veces o mayor en su replicación en ratones SCID-HuH-7 (tabla 11). Cada uno de los cinco contenía una o más mutaciones imprevistas. En un virus, rDEN4 Δ 30-436-437, la mutación adicional se ha asociado anteriormente con adaptación a células Vero (Blaney, J.E. Jr. *et al.* 2002 Virology 300:125-139). Cada uno de los virus restantes contenía al menos una mutación incidental cuyo efecto fenotípico se desconoce. En consecuencia, los fenotipos descritos no pueden atribuirse directamente a las mutaciones de carga a alanina. Sin embargo, el hecho de que los virus rDEN4 y rDEN4 Δ 30 que portan las mismas mutaciones de carga a alanina compartan fenotipos similares proporciona un fuerte apoyo a la capacidad de las mutaciones de carga a alanina para potenciar la atenuación de rDEN4 Δ 30. Debido a que rDEN4-436-437 [clon 1] contenía 4 mutaciones imprevistas, se preparó un segundo clon de este virus. rDEN4-436-437 [clon 2] contenía solo una mutación incidental (tabla 11), y mostró los mismos fenotipos que rDEN4-436-437 en cultivo celular y ratones SCID-HuH-7. Se usó rDEN4-436-437
20 [clon 2] en el estudio con monos rhesus descrito a continuación.
25
30

Tabla 9. La adición de mutaciones de carga a alanina a rDEN4Δ30 confiere un fenotipo ts tanto en células Vero como HuH-7.

| Virus | AA cambiados b | N.º de cambios | Título de virus medio (log ₁₀ UFP/ml) a la temperatura indicada (°C) ^a | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------|-------------------|--|-----|------|------|----------------|-----|-------|------|------|------|--|--|
| | | | Vero | | | | | | HuH-7 | | | | | |
| | | | 35 | 37 | 38 | 39 | Δ ^c | 35 | 37 | 38 | 39 | Δ | | |
| rDEN4 | ninguno | 0 | 7,4 | 7,1 | 7,7 | 7,2 | 0,2 | 7,7 | 7,5 | 7,5 | 7,4 | 0,3 | | |
| rDEN4Δ30 | ninguno | 30 | 6,6 | 6,6 | 6,5 | 6,5 | 0,1 | 7,4 | 6,9 | 7,0 | 6,4 | 1,0 | | |
| rDEN4-23-24 | KE | 3 | 6,7 | 6,6 | 6,0 | 6,5 | 0,2 | 7,1 | 7,3 | 5,6 | <1,7 | >5,4 | | |
| rDEN4Δ30-23-24 | | | 6,1 | 5,5 | 4,9 | <1,7 | 4,4 | 6,5 | 5,9 | 4,7 | <1,7 | >4,2 | | |
| rDEN4-200-201 | KH | 4 | 5,3 | 4,8 | 4,8 | 4,3 | 1,0 | 5,7 | 5,4 | 2,7 | <1,7 | >4,0 | | |
| rDEN4Δ30-200-201 | | | 6,0 | 5,3 | 5,6 | <1,7 | >4,3 | 5,8 | 5,0 | 5,9 | <1,7 | >4,1 | | |
| rDEN4-436-437 | DK | 4 | 5,2 | 4,2 | 3,4 | 1,9 | 3,3 | 5,9 | 4,9 | 3,2 | <1,7 | >4,2 | | |
| rDEN4Δ30-436-437 [clon 1] | | | 6,3 | 5,7 | 5,5 | <1,7 | >4,6 | 6,5 | 5,7 | 5,1 | <1,7 | >4,8 | | |
| rDEN4-808-809 | ED | 3 | 4,6 | 4,1 | <1,7 | <1,7 | >2,9 | 5,2 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | >3,5 | | |
| rDEN4Δ30-808-809 | | | 5,6 | 4,9 | 4,9 | <1,7 | >3,9 | 5,9 | 4,8 | 5,1 | <1,7 | >4,2 | | |
| rDEN4-23-24-200-201 | KE, KH | 7 | 6,0 | 5,2 | 4,2 | <1,7 | >4,3 | 6,9 | 6,3 | <1,7 | <1,7 | >5,2 | | |
| rDEN4Δ30-23-24-200-201 | | | 4,5 | 4,2 | 4,8 | <1,7 | >2,8 | 4,9 | 4,5 | 2,9 | <1,7 | >3,2 | | |
| rDEN4-23-24-396-397 | KE, RE | 7 | 6,5 | 5,8 | 5,5 | <1,7 | >4,8 | 7,1 | 5,9 | 5,4 | <1,7 | >5,4 | | |
| rDEN4Δ30-23-24-396-397 | | | 6,1 | 5,2 | 4,8 | <1,7 | >4,4 | 6,9 | 5,4 | 4,9 | <1,7 | >5,2 | | |
| rDEN4-436-437-808-809 | DK, ED | 7 | 4,9 | 4,9 | 5,1 | <1,7 | >3,2 | 5,5 | 3,2 | <1,7 | <1,7 | >3,8 | | |

^a Los valores subrayados indican una reducción de 2,5 ó 3,5 log₁₀ UFP/ml en el título en células Vero o HuH-7, respectivamente, a la temperatura indicada en comparación con la temperatura permisiva (35°C).

^b Par(es) de aminoácidos cambiados a par de restos de Ala.

^c Reducción en el título (log₁₀ ufp/ml) en comparación con la temperatura permisiva(35°C).

Tabla 10. La adición de mutaciones de carga a alanina atenua rDEN4Δ30 en cerebro de ratón lactante y potencia la atenuación en ratones SCID-HuH-7

| Virus | Replicación en ratones lactantes ^a | | | Replicación en ratones SCID-HuH-7 ^c | | |
|---------------------------|---|---|---|--|--|---|
| | n | Título de virus medio ± EE (log ₁₀ UFP/g de cerebro) | Reducción log media con respecto al tipo natural ^b | n | Título de virus medio ± EE (log ₁₀ UFP/ml de suero) | Reducción log media con respecto al tipo natural ^d |
| rDEN4 | 18 | 6,2 ± 0,4 | -- | 33 | 5,4 ± 0,3 | -- |
| rDEN4Δ30 | 12 | 5,9 ± 0,8 | 0,2 | 8 | 3,4 ± 0,3 | 2,3 |
| rDEN4-23-24 | 18 | 4,7 ± 0,1 | 1,6 | 19 | 4,7 ± 0,5 | 1,3 |
| rDEN4Δ30-23-24 | 6 | 5,6 ± 0,3 | 0,7 | 7 | 4,6 ± 0,4 | 1,5 |
| rDEN4-200-201 | 12 | 5,5 ± 0,5 | 0,6 | 12 | 3,7 ± 0,2 | 2,6 |
| rDEN4Δ30-200-201 | 6 | 5,5 ± 0,6 | 0,1 | 4 | 3,3 ± 0,6 | 1,8 |
| rDEN4-436-437 | 18 | 2,7 ± 0,4 | 3,5 | 10 | 2,9 ± 0,7 | 2,5 |
| rDEN4Δ30-436-437 [clon 1] | 6 | 2,9 ± 0,3 | 3,4 | 4 | 2,3 ± 0,4 | 2,8 |
| rDEN4-808-809 | 6 | 1,8 ± 0,1 | 3,1 | 8 | 3,2 ± 0,4 | 3,0 |
| rDEN4Δ30-808-809 | 12 | 3,9 ± 0,7 | 2,1 | 4 | 3,7 ± 0,6 | 2,4 |
| rDEN4-23-24-200-201 | 12 | 5,3 ± 0,5 | 0,7 | 13 | 3,4 ± 0,1 | 2,9 |
| rDEN4Δ30-23-24-200-201 | 6 | 3,0 ± 0,2 | 2,6 | 5 | 1,8 ± 0,1 | 3,3 |
| rDEN4-23-24-396-397 | 12 | 4,6 ± 0,9 | 1,5 | 8 | 3,6 ± 0,3 | 2,3 |
| rDEN4Δ30-23-24-396-397 | 6 | 3,0 ± 0,2 | 2,6 | 5 | 2,2 ± 0,3 | 2,9 |
| rDEN-436-437-808-809 | 6 | < 1,7 ± 0,0 | 3,6 | 8 | 2,1 ± 0,3 | 2,4 |

^aSe inocularon a grupos de seis ratones lactantes por vía i.c. 10⁴ UFP de virus en un inóculo de 30 µl. Se extrajo el cerebro 5 días después, se homogeneizó y se cuantificó el virus mediante titulación en células Vero.

^b Determinada comparando los títulos virales medios en ratones inoculados con virus de muestra y controles de tipo natural simultáneos (n = 6). El fenotipo de atenuación (att) se define como una reducción de ≥ 1,5 log₁₀ UFP/g en comparación con el virus de tipo natural; se indican reducciones de ≥ 1,5 en negrita.

^c Se inocularon a grupos de ratones SCID-HuH-7 directamente en el tumor 10⁴ UFP de virus.

^d Determinada comparando los títulos virales medios en ratones inoculados con virus de muestra y controles de tipo natural simultáneos. El fenotipo de atenuación se define como una reducción de ≥ 1,5 log₁₀ UFP/g en comparación con el virus de tipo natural; se indican reducciones de ≥ 1,5 en negrita.

Tabla 11. Mutaciones de UTR y de cambio de sentido presentes en derivados de virus rDEN4 que portan la mutación de carga a alanina y Δ30

| Virus | Gen ^{a,b} | Posición nucleótido | de Sustitución nucleótidos | de Posición de aminoácido ^c | Cambio de aminoácidos ^b |
|------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|--|------------------------------------|
| rDEN4-200-201 | prM | 626 | A > T | 61 | Glu > Asp |
| | NS4A | 6659 | C > T | 93 | Leu > Phe |
| rDEN4Δ30-200-201 | NS5 | 8160-8165 | AAACA > GCAGC | 200-201 | LysHis > AlaAla |
| | NS3 | 4830 | G > A | 102 | Gly > Arg |
| | NS5 | 8106 | G > A | 181 | Val > Ile |
| | NS5 | 8160-8165 | AAACA>GCAGC | 200-201 | LysHis > AlaAla |
| | 3'-UTR | 10478-10507 | delección Δ30 | Ninguna | Ninguno |
| rDEN4-436-437 [clon 1] | E | 2331 | T > G | 464 | Trp > Gly |
| | NS1 | 2845 | C > T | 140 | Ser > Phe |
| | NS3* | 4891 | T > C | 122 | Ile> Thr |
| | NS5 | 8869-8873 | GACAA > GCAGC | 436-437 | AspLys > AlaAla Lys > Arg |
| | NS5 | 9659 | A > G | 699 | Val > Ala |
| | NS4B | 7153 | T > C | 108 | AspLys > AlaAla |
| | NS5 | 8869-8873 | GACAA > GCAGC | 436-437 | Leu > Phe |
| | NS4B* | 7163 | A > C | 111 | AspLys > AlaAla |
| | NS5 | 8869-73 | GACAA > GCAGC | 436-437 | AspLys > AlaAla |
| | 3'-UTR | 10478-10507 | delección Δ30 | Ninguna | Ninguno |
| rDEN4-23-24-200-201 | NS3 | 6751 | A > C | 124 | Lys > Thr |
| | NS5 | 7629-7633 | AAAGA>GCAGC | 23-24 | LysGlu > AlaA1a |
| | NS5 | 8160-8165 | AAACA > GCAGC | 200-201 | LysHis > AlaAla |

^a El asterisco indica mutación de adaptación a células Vero identificada previamente.

^b Los valores en negrita indican mutaciones diseñadas para producirse en los virus designados.

^c Posición de aminoácido en el producto de proteína del gen de DEN4 designado; la numeración se inicia con el extremo amino-terminal de la proteína.

Basándose en la atenuación en el modelo de ratón SCID-HuH7, se evaluaron cuatro de los virus mutantes de carga a alanina (rDEN4-200-201, rDEN4 Δ 30-200-201, rDEN4-436-437 [clon 2], rDEN4 Δ 30-436-437) en macacos rhesus tal como se describió anteriormente. Como con el estudio de virus que portaban mutaciones puntuales atenuantes, se detectó viremia en el día 1 tras la infección y acabó para el día 4 en todos los monos (figura 4, tabla 12). Se detectó viremia en la mayoría de los monos infectados; solo uno de los cuatro monos infectados con rDEN4 Δ 30-200-201 y uno de los cuatro monos infectados con rDEN4 Δ 30-436-437 no mostraron viremia detectable. Los monos infectados con rDEN4 mostraron el mayor título de virus de pico medio; y en cada caso los virus que portaban la mutación Δ 30 mostraron una disminución de aproximadamente 0,5 log en el título de virus pico medio en relación con sus virus originales y una disminución de 0,5 a 2 días en el número medio de días virémicos por mono. Los monos infectados con virus que portaban las mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina mostraron una reducción de dos veces en la viremia de pico medio en relación con los infectados con rDEN4 Δ 30. Esto sugiere que la adición de las mutaciones de carga a alanina atenúa adicionalmente rDEN4 Δ 30 para macacos rhesus.

Tal como se esperaba, ninguno de los monos en este estudio mostró niveles detectables de anticuerpos neutralizantes en el día 0. En el día 28, cada mono infectado con un virus mostró niveles detectables de anticuerpos neutralizantes, lo que indica que todos los monos, incluso los que no mostraban viremia detectable, se habían infectado realmente. Como en el estudio de mutaciones puntuales atenuantes, los monos infectados con rDEN4 tenían un título de anticuerpos neutralizantes séricos medio (dilución recíproca) que era aproximadamente dos veces el de monos que se habían infectado con rDEN4 Δ 30. Los monos infectados con rDEN4-200-201 y rDEN4-436-437 [clon 2] tenían títulos de anticuerpos neutralizantes medios similares a rDEN4, y los infectados con rDEN4 Δ 30-200-201 y rDEN4 Δ 30-436-437 tenían títulos de anticuerpos neutralizantes medios similares a rDEN4. En cada caso, la adición de la mutación Δ 30 a un virus dio como resultado una disminución de dos veces en los anticuerpos neutralizantes. Por tanto, aunque la adición de mutaciones de carga a alanina a rDEN4 Δ 30 disminuyó la viremia de pico medio por debajo de la de rDEN4 Δ 30 solo, no afectó a los niveles de anticuerpos neutralizantes.

Tabla 12. La adición de mutaciones de carga a alanina apareadas a rDEN4 Δ 30 atenúa adicionalmente el virus para monos Rhesus

| Virus ^a | N.º de monos | N.º de monos con viremia | N.º medio de días virémicos por mono ^b | Título de virus pico medio (log ₁₀ UFP/ml \pm EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|---------------------------|--------------|--------------------------|---|--|---|--------|
| | | | | | Día 0 | Día 28 |
| simulado | 2 | 0 | 0 | <0,7 | <5 | <5 |
| rDEN4 | 2 | 2 | 2,5 | 2,6 \pm 0,3 | <5 | 276 |
| rDEN4 Δ 30 | 2 | 2 | 2,0 | 2,1 \pm 0,1 | <5 | 131 |
| rDEN4-200,201 | 4 | 4 | 2,3 | 1,8 \pm 0,3 | <5 | 212 |
| rDEN4 Δ 30-200,201 | 4 | 3 | 1,5 | 1,3 \pm 0,2 | <5 | 139 |
| rDEN4-436,437 [clon 2] | 4 | 4 | 3,3 | 1,8 \pm 0,2 | <5 | 273 |
| rDEN4 Δ 30-436,437 | 4 | 3 | 1,3 | 1,0 \pm 0,0 | <5 | 143 |

^a Se inocularon a grupos de monos rhesus por vía subcutánea 10⁶ UFP del virus indicado en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días de 0 a 6, 8, 10 y 28. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

^b No se detectó viremia en ningún mono tras el día 4.

Tras la exposición a rDEN4 en el día 28, los monos infectados de manera simulada tenían un título de virus de pico medio de 1,5 log₁₀ UFP/ml y un número medio de días virémicos de 3,0 (tabla 13). Sin embargo, ninguno de los monos inoculado previamente con rDEN4, rDEN4 Δ 30 o los virus mutantes de carga a alanina mostró viremia detectable. Adicionalmente, ninguno de los monos mostró un aumento mayor de cuatro veces en el título de anticuerpos neutralizantes séricos. En conjunto, estos datos indican que la infección con cualquiera de los virus, incluyendo los que portan mutaciones tanto Δ 30 como de carga a alanina, protegían a los macacos rhesus frente a la exposición a rDEN4.

Tabla 13. rDEN4 Δ 30 que contiene mutaciones de carga a alanina protege a monos rhesus frente a la exposición a virus DEN4 de tipo natural

| Virus ^a | N.º de monos | N.º medio de días virémicos por mono tras la exposición a rDEN4 | Título de virus pico medio (log ₁₀ UFP/ml ± EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|----------------------|--------------|---|--|---|--------|
| | | | | Día 28 | Día 56 |
| simulado | 2 | 3,0 | 1,5 ± 0,7 | <5 | 284 |
| rDEN4 | 2 | 0,0 | <0,7 | 276 | 316 |
| rDEN4Δ30 | 2 | 0,0 | <0,7 | 131 | 96 |
| rDEN4-200,201 | 4 | 0,0 | <0,7 | 212 | 356 |
| rDEN4Δ30-200,201 | 4 | 0,0 | <0,7 | 139 | 132 |
| rDEN4-436,437 [cl 2] | 4 | 0,0 | <0,7 | 273 | 401 |
| rDEN4Δ30-436,437 | 4 | 0,0 | <0,7 | 143 | 182 |

^a 28 días tras la inoculación primaria con los virus indicados, se expusieron monos rhesus por vía subcutánea a 10⁵ UFP de virus rDEN4 en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días de 28 a 34, 36, 10 y 56. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

La adición de mutaciones de carga a alanina a rDEN4Δ30 puede conferir una gama de fenotipos *ts* tanto en células Vero como HuH-7 y fenotipos *att* en cerebro de ratón lactante y puede o bien potenciar o bien dejar sin cambios la atenuación en ratones SCID-HuH-7. De la manera más importante, la adición de estas mutaciones puede disminuir la viremia producida por rDEN4Δ30 en macacos rhesus sin disminuir el título de anticuerpos neutralizantes o la eficacia protectora. Por tanto, se contempla que la adición de tales mutaciones a rDEN4Δ30 potencia la atenuación en seres humanos. Además, se contempla que las mutaciones que están añadiéndose no cambian el nivel global de atenuación, sino que estabilizan el fenotipo de atenuación porque por sí mismas son atenuantes independientemente incluso en ausencia de la mutación Δ30. Las mutaciones de carga a alanina son particularmente útiles porque se producen fuera de las regiones génicas estructurales, y por tanto pueden usarse para atenuar virus quiméricos con genes estructurales. Además, implican cambios de al menos tres nucleótidos, lo que hace que sea poco probable que reviertan a la secuencia de tipo natural.

Se ha identificado una serie de mutaciones puntuales que potencian la replicación de rDEN4 en cultivo tisular de células Vero; estas se ubican principalmente en el gen NS4B (Blaney, J. E. *et al.* 2002 *Virology* 300:125-139; Blaney, J. E. *et al.* 2001 *J Virol* 75:9731-9740). Las mutaciones de adaptación de células Vero confieren dos características deseables para un candidato a vacuna. En primer lugar, potencian el rendimiento de virus en células Vero, el sustrato previsto para la producción de la vacuna, y por tanto hacen que la producción de la vacuna sea más rentable. En segundo lugar, aunque cada una de estas mutaciones de adaptación de Vero son mutaciones puntuales, es probable que sean extremadamente estables durante la fabricación de la vacuna, porque proporcionan una ventaja selectiva en células Vero. También se mostró que al menos una mutación de adaptación de células Vero, en la posición 7129, disminuía la infectividad en mosquitos de rDEN4; una escasa infectividad en mosquitos es otra característica deseable de un candidato a vacuna del dengue. Para investigar la generalidad de este hallazgo, los presentes inventores sometieron a prueba el efecto del resto de las mutaciones de adaptación a células Vero sobre la capacidad de rDEN4 para infectar mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con harina de sangre infecciosa. La tabla 14 muestra la infectividad de cada virus que porta una única mutación de adaptación a células Vero a título alto. De éstas, solo una mutación, en la posición 7182, estaba asociada con una disminución grande de la infectividad en mosquitos. Por tanto, 7182 puede ser una mutación particularmente valiosa para incluir en un candidato a vacuna de rDEN4, ya que tiene efectos opuestos sobre la replicación en células Vero y en mosquitos.

Tabla 14. Efecto de las mutaciones de adaptación a células Vero sobre la infectividad en mosquitos de rDEN4

| Virus | <i>Aedes aegypti</i> (infección oral) | | | |
|------------|--|-----------------------|------------------------------|--------|
| | Dosis ^a (log ₁₀ ufp) | N.º sometido a prueba | % de infectados ^b | |
| | | | Intestino medio | Cabeza |
| rDEN4 | 4,3 | 27 | 70 | 25 |
| rDEN4-4891 | 4,4 | 23 | 74 | 13 |
| rDEN4-4995 | 4,8 | 20 | 80 | 50 |
| rDEN4-7153 | 4,8 | 20 | 80 | 30 |
| rDEN4-7546 | 4,6 | 20 | 55 | 10 |
| rDEN4-7162 | 5,0 | 20 | 55 | 25 |
| rDEN4-7163 | 4,9 | 15 | 73 | 72 |

| Virus | <i>Aedes aegypti</i> (infección oral) | | | |
|------------|--|--------------|---|------------------------------|
| | Dosis ^a (log ₁₀ ufp) | N.º sometido | a | % de infectados ^b |
| rDEN4-7182 | 5,0 | 20 | | 20 |
| rDEN4-7630 | 4,3 | 10 | | 70 |

^a Título de virus ingerido, suponiendo 2 µl de harina de sangre.

^b Porcentaje de mosquitos con antígeno detectable por IFA en tejido del intestino medio o la cabeza preparado 21 días tras la infección oral.

EJEMPLO COMPARATIVO 2

Generación y caracterización de un virus DEN1 recombinante que contiene la mutación Δ30

5

En primer lugar, los presentes inventores buscaron determinar si la mutación Δ30 podía atenuar satisfactoriamente un virus DEN de tipo silvestre distinto del serotipo DEN4. Para hacer esto, se introdujo la mutación Δ30 en el ADNc de DEN1 (Pacífico occidental). Se digirió el clon de ADNc pRS424DEN1WP (Puri, B. *et al.* 2000 *Virus Genes* 20:57-63) con *Bam*HI y se usó como molde en una PCR usando polimerasa Pfu con el cebador directo 30 (nt 10515-10561 y 10592-10607 de DEN1) y el cebador de secuenciación inverso M13 (101 nt más allá del extremo 3' de la secuencia del genoma de DEN1). El producto de PCR resultante tenía 292 pb y contenía la mutación Δ30. Se digirió parcialmente el ADNc de pRS424DEN1WP con *Apa* I, luego se digirió hasta el final con *Sac* II y se aisló el vector en gel, se mezcló con el producto de PCR y se usó para transformar la cepa de levadura YPH857 para producir crecimiento sobre placas que carecen de triptófano (Polo, S. *et al.* 1997 *J Virol* 71:5366-74). Se confirmaron colonias de levaduras positivas mediante PCR y análisis con enzimas de restricción. Se usó ADN aislado de dos colonias de levaduras independientes para transformar la cepa STBL2 de *E. coli*. Se preparó ADN de plásmido adecuado para generar transcritos de ARN y se verificó la presencia de la mutación Δ30 mediante análisis de secuencia.

10

15

20

25

30

Para la transcripción y generación de virus, se usó ADNc (designado pRS424DEN1Δ30) que se linealizó con *Sac* II como molde en una reacción de transcripción usando ARN polimerasa SP6 tal como se describió (Polo, S. *et al.* 1997 *J Virol* 71:5366-74). Se introdujeron por electroporación reacciones de transcripción en células LLC-MK2 y se confirmó la infección mediante observación del CPE e inmunofluorescencia y se recogieron en el día 14. Se amplificaron reservas de virus en células de mosquito C6/36 y se titularon en células LLC-MK2. Se secuenció el genoma del virus resultante, rDEN1Δ30, para confirmar la presencia de la mutación Δ30. La mutación Δ30 elimina los nucleótidos 10562-10591 de DEN1 (figura 2B, C), que corresponde a la TL2 de DEN1. El virus se replica de manera eficaz en cultivo de células Vero a títulos de 6,5 log₁₀ UFP/ml, lo que indica que la mutación Δ30 es compatible con un crecimiento eficaz de DEN1 en cultivo celular, una propiedad esencial para la fabricación de la vacuna. Usando técnicas similares, se generó un virus original rDEN1. Se identificaron mutaciones imprevistas que surgieron del pase del virus en cultivo tisular tanto en rDEN1 como rDEN1Δ30 usando análisis de secuencia y se indican en la tabla 15. Se derivó un virus rDEN1Δ30 adicional mediante transfección y amplificación en células Vero. Aunque este virus no se evaluó en los estudios descritos a continuación, su análisis de secuencias se incluye en la tabla 15. A continuación se examinaron las propiedades de rDEN1Δ30 como vacuna *in vivo*.

35

Tabla 15. Mutaciones de cambio de sentido presentes entre los virus DEN1 recombinantes y correlación de mutaciones de la región NS4B con las encontradas en DEN4

| Virus | Tipo de célula de transfección | Gen | Posición de nucleótido | Cambio de nucleótidos | Posición de aminoácido | Cambio de aminoácidos |
|-----------------------|--------------------------------|------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| rDEN1 de tipo natural | LLC-MK2 | prM | 816 | C > U | 241 | Ala > Val |
| | | NS4B | 7165 ^a | U > G | 2357 | Phe > Leu |
| | | NS4B | 7173 ^b | U > C | 2360 | Val > Ala |
| rDEN1Δ30 | LLC-MK2 | E | 1748 | A > U | 552 | Thr > Ser |
| rDEN1Δ30 | Vero | E | 1545 | A > G | 484 | Lys > Arg |

^a Mismo nucleótido que 7154 en rDEN4.

^b Mismo nucleótido que 7162 en rDEN4

* Comparación de nucleótidos y aminoácidos de la región NS4B seleccionada:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|---|----|---|-------|---|---|---|----|---|-------|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | | | | | | | | | | | | | | | |
| DEN4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| base | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Número: | 890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ++ | ++ | + | +++++ | + | + | + | ++ | + | +++++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | | | | | | |
| D4 7128- | <u>CC</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>J</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D1 7139- | <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D2 7135- | <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D3 7130- | <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | P | L | T | L | T | A | A | V | L | L | L | L | V | A | H | T | A | I | I | G | P |
| | + | + | + | + | + | | | | | | | | + | | + | + | + | + | + | + | + |

D4 = rDEN4
D1 = rDEN1(WP)
D2 = rDEN2(Tonga/74)
D3 = rDEN3(Sleman/78)

+Homología entre los cuatro serotipos

5 Los nucleótidos están subrayados en múltiplos pares de 10.

Se realizó la evaluación de la replicación, inmunogenicidad y eficacia protectora de rDEN1Δ30 y el virus rDEN1 original de tipo silvestre (derivado del ADNc de pRS424DEN1WP) en monos rhesus juveniles tal como sigue. Se inyectaron por vía subcutánea a monos seronegativos para el virus del dengue 5,0 log₁₀ UFP de virus en una dosis de 1 ml dividida entre dos inyecciones en cada lado de la zona del hombro superior. Se observaron los monos diariamente y se recogió sangre en los días 0 - 10 y 28 y se almacenó el suero a -70°C. Se determinó el título de virus en muestras de suero mediante ensayo de placas en células Vero tal como se describió anteriormente (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Se determinaron los títulos de neutralización por reducción de placas para las muestras de suero del día 28 tal como se describió anteriormente (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Se expusieron todos los monos en el día 28 a una única dosis de 5,0 log₁₀ UFP de rDEN1 de tipo natural y se recogió sangre durante 10 días. Se determinó el título de virus en sueros tras la exposición mediante ensayo de placas en células Vero. Los monos a los que se les inoculó rDEN1 de tipo natural de longitud completa fueron virémicos durante 2 - 3 días con un título de pico medio de 2,1 log₁₀ UFP/ml (tabla 16), y los monos a los que se les inoculó rDEN1Δ30 fueron virémicos durante menos de 1 día con un título de pico medio de 0,8 log₁₀ UFP/ml, lo que indica que la mutación Δ30 puede atenuar DEN1. Tal como se esperaba para un virus atenuado, la respuesta inmunitaria, tal como se midió mediante el título de anticuerpos neutralizantes, era inferior tras la inoculación con rDEN1Δ30 en comparación con la inoculación con rDEN1 de tipo silvestre (tabla 16), aunque suficientemente alta para proteger a los animales frente a la exposición con el virus DEN1 de tipo silvestre. No se detectó rDEN1 de tipo silvestre en ninguna muestra de suero recogida tras la exposición al virus, lo que indica que los monos estaban completamente protegidos tras la inmunización con o bien rDEN1 de tipo silvestre de longitud completa o bien el virus recombinante rDEN1Δ30. El nivel de atenuación especificado por la mutación Δ30 era comparable en los antecedentes genéticos tanto de DEN1 como de DEN4 (figura 5).

Tabla 16. La mutación Δ30 atenúa rDEN1 para monos Rhesus

| Virus* | n | N.º medio de días viremia | Título pico medio (log ₁₀ ufp/ml) | Título de neutralización medio | Título pico medio del virus de exposición |
|----------|---|---------------------------|--|--------------------------------|---|
| rDEN1 | 4 | 2,8 | 2,1 | 1230 | <0,7 |
| rDEN1Δ30 | 4 | 0,5 | 0,8 | 780 | <0,7 |

* Se inocularon a monos rhesus por vía subcutánea 5,0 log₁₀ UFP de virus. Se recogieron muestras de suero diariamente durante 10 días. Se recogió suero para el ensayo de neutralización en el día 28. Todos los monos se expusieron en el día 28 a 5,0 log₁₀ UFP de rDEN1.

Tal como se documentó anteriormente, el virus rDEN4 se replicó a más de 6,0 log₁₀ UFP/ml de suero en ratones SCID-HuH-7, mientras que la replicación del virus rDEN4 que porta la mutación Δ30 se redujo en aproximadamente 10 veces (Blaney, J.E. Jr. *et al.* 2002 Virology 300:125-139). Se comparó la replicación de rDEN1Δ30 con la de rDEN1 de tipo silvestre en ratones SCID-HuH-7 (tabla 17). rDEN1Δ30 se replicó a un nivel de aproximadamente 100

veces menos que su original rDEN1 de tipo silvestre. Este resultado valida adicionalmente el uso del modelo de ratón SCID-HuH-7 para la evaluación de cepas atenuadas de virus DEN, con resultados que se correlacionan estrechamente con los observados en monos rhesus.

5

Tabla 17. La mutación Δ30 atenúa rDEN1 para ratones HuH-7-SCID

| Virus | N.º de ratones ⁵ | Título de virus pico medio ⁶ (log ₁₀ ufp/ml ± EE) |
|-----------------------|-----------------------------|---|
| rDEN1 de tipo natural | 9 | 7,3 ± 0,2 |
| rDEN1Δ30 | 8 | 5,0 ± 0,3 |

⁵ Se inocularon a grupos de ratones HuH-7-SCID directamente en el tumor 4,0 log₁₀ ufp de virus. Se recogió suero en el día 6 y 7, se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

⁶ Se encontró diferencia significativa entre los virus rDEN1 y rDEN1Δ30, prueba de Tukey-Kramer (P < 0,005).

Finalmente, se evaluó la infectividad de rDEN1 y rDEN1Δ30 para mosquitos, usando los métodos descritos en detalle en el ejemplo de referencia 5. Previamente, se mostró que la mutación Δ30 disminuía la capacidad de rDEN4 para cruzar la barrera del intestino medio del mosquito y establecer una infección de las glándulas salivales (Troyer, J.M. *et al.* 2001 *Am J Trop Med Hyg* 65:414-419). Sin embargo, ni rDEN1 ni rDEN1Δ30 pudieron infectar el intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* eficazmente por medio de una harina de sangre artificial (tabla 18), de modo que no era posible determinar si Δ30 podría bloquear adicionalmente la infección de glándulas salivales. Un estudio previo también mostró que la Δ30 no tenía ningún efecto sobre la infectividad rDEN4 para mosquitos *Toxorhynchites splendens* infectados por medio de inoculación intratorácica (Troyer, J.M. *et al.* 2001 *Am J Trop Med Hyg* 65:414-419), y se observó un patrón similar para rDEN1 y rDEN1Δ30 (tabla 18). La base genética para la incapacidad de rDEN1 para infectar el intestino medio del mosquito no se ha definido en este momento. Sin embargo, esta importante propiedad de infectividad restringida para el intestino medio del mosquito es sumamente deseable en un candidato a vacuna puesto que serviría para restringir en gran medida la transmisión del virus de vacuna desde un vacunado hasta un vector de mosquito.

10

15

20

Tabla 18. Los virus DEN1 y DEN1Δ30 son ambos sumamente infecciosos para *Toxorhynchites splendens*, pero no infectan *Aedes aegypti* eficazmente

| Virus | <i>Toxorhynchites splendens</i> (inoculación intratorácica) | | | <i>Aedes aegypti</i> (infección oral) | | | |
|--------------|--|-----------------------|----------------------------------|---|-----------------------|-------------------------------|--------|
| | Dosis ^a (log ₁₀ ufp) | N.º sometido a prueba | % infectados ^b de | Dosis ^c (log ₁₀ ufp) | N.º sometido a prueba | % de infectados ^d | |
| | | | | | | Intestino medio | Cabeza |
| rDEN1 | 3,5 | 7 | 100 | 4,0 | 26 | 11 | 0 |
| | 2,5 | 8 | 75 | | | | |
| | 1,5 | 7 | 71 | | | | |
| | 0,5 | 5 | 60 | | | | |
| | | | DMI₅₀ < 0,5 | | | DMI₅₀ ≥ 4,4 | |
| rDEN1 Δ30 | 2,7 | 8 | 100 | 3,2 | 20 | 10 | 0 |
| | 1,7 | 7 | 100 | | | | |
| | 0,7 | 6 | 83 | | | | |
| | | | DMI₅₀ < 0,7 | | | DMI₅₀ ≥ 3,6 | |

^a Cantidad de virus presente en un inóculo de 0,22 µl.

^b Porcentaje de mosquitos con antígeno detectable por IFA en tejido de cabeza preparado 14 días tras la inoculación.

^c Título de virus ingerido, suponiendo una harina de sangre de 2 µl.

^d Porcentaje de mosquitos con antígeno detectable por IFA en tejido de cabeza o intestino medio preparado 21 días tras la infección oral. Cuando se detectó infección por virus, pero no superaba una frecuencia del 50% a la dosis más alta de virus ingerido, se estimó la DMI₅₀ suponiendo que un virus concentrado 10 veces más infectaría al 100% de los mosquitos.

25 Por tanto, la mutación Δ30, descrita por primera vez en DEN4, se transfirió satisfactoriamente a rDEN1. Se demostró que el virus resultante, rDEN1Δ30, estaba atenuado en monos y ratones SCID-HuH-7 a niveles similares al virus

recombinante rDEN4 Δ 30, estableciendo de ese modo la conservación del fenotipo de atenuación especificado por la mutación Δ 30 en un antecedente de virus DEN diferente. Basándose en los resultados favorables de rDEN4 Δ 30 en ensayos clínicos recientes (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13), se pronostica que rDEN1 Δ 30 estará adecuadamente atenuado en seres humanos. Para completar la vacuna tetravalente, se contempla preparar virus recombinantes rDEN2 y rDEN3 atenuados que portan la mutación Δ 30 (véanse los ejemplos 3 y 4 más adelante). La demostración de que la mutación Δ 30 especifica un fenotipo que puede transportarse a otro serotipo de DEN tiene importantes implicaciones para el desarrollo de la vacuna tetravalente. Esto indica que se espera que la mutación Δ 30 tenga un efecto correspondiente sobre los virus de tipo natural DEN2 y DEN3.

10 EJEMPLO COMPARATIVO 3

Generación y caracterización de un virus DEN2 recombinante que contiene la mutación Δ 30

15 La evaluación de rDEN1 Δ 30 mostró que estaba atenuado de manera satisfactoria. Basándose en este resultado, se buscó extender esta tecnología a la creación de un candidato a vacuna contra DEN2. Para hacer esto, se introdujo la mutación Δ 30 en el ADNc de DEN2. Se eligió un virus DEN2 aislado de una epidemia de dengue de 1974 en el Reino de Tonga (Tonga/74) (Gubler, D. J. *et al.* 1978 Am J Trop Med Hyg 27:581-589) para representar DEN2 de tipo silvestre. Se secuenció el genoma de DEN2 (Tonga/74) en su totalidad y sirvió como secuencia consenso para la construcción de un clon de ADNc de longitud completa (apéndice 1). Se generaron fragmentos de ADNc de DEN2 (Tonga/74) mediante transcripción inversa del genoma tal como se indica en la figura 6A. Se subclonó cada fragmento en un vector de plásmido y se secuenció para verificar que correspondía con la secuencia consenso tal como se determinó para el virus. Esto produjo siete fragmentos de ADNc clonados que abarcaban el genoma. Se modificaron los fragmentos clonados tal como sigue: el fragmento X, que representa el extremo 5' del genoma, se puso colindante al promotor de SP6; se modificó el fragmento L para que contuviese un sitio de restricción *SpeI* silencioso en la traducción en el nucleótido genómico 2353; se modificó el fragmento R para que contuviese un sitio de restricción *SpeI* silencioso en la traducción en el nucleótido genómico 2353, y para estabilizar el clon de longitud completa final, se crearon dos mutaciones silenciosas en la traducción adicionales en los nucleótidos 2362 - 2364 y 2397 para garantizar que estuviesen presentes codones de terminación de la traducción en todos los marcos de lectura distintos del usado para sintetizar la poliproteína del virus; se modificó el fragmento A en el nucleótido 3582 para suprimir un sitio de restricción *SpeI* que se produce de manera natural y en el nucleótido 4497 para suprimir un sitio de restricción *KpnI* que se produce de manera natural; se modificó el fragmento C en el nucleótido 9374 para suprimir un sitio de restricción *KpnI* que se produce de manera natural; y el fragmento Y, que representaba el extremo 3' del genoma, se puso colindante al sitio de restricción *KpnI*. Se añadió cada fragmento progresivamente entre los sitios de restricción *AsclI* y *KpnI* del clon p4 de ADNc de DEN4 (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) para generar un clon de ADNc de DEN2 de longitud completa (p2) con el mismo antecedente de vector usado satisfactoriamente para generar rDEN4 y rDEN4 Δ 30. Se secuenció el clon p2 de ADNc para confirmar que la región genómica del virus correspondía con la secuencia consenso de DEN2 (Tonga/74), con la excepción de las modificaciones silenciosas en la traducción indicadas anteriormente. Se introdujo la mutación Δ 30 en el fragmento Y para generar el fragmento Y Δ 30. Para crear p2 Δ 30, se sustituyó la región del fragmento Y de p2 por el fragmento Y Δ 30 (figura 6A, B).

45 Para la transcripción y generación de virus infecciosos, se linealizó ADNc (p2 y p2 Δ 30) con *Acc65I* (isoesquizómero de *KpnI* que se escinde dejando solo un único nucleótido en 3') y se usó como molde en una reacción de transcripción usando ARN polimerasa SP6 tal como se describió anteriormente (Blaney, J. E. *et al.* 2002 Virology 300:125-139). Se introdujeron transcritos en células *Vero* o células de mosquito C6/36 usando transfección mediada por liposomas y se recogieron sobrenadantes de cultivo celular en el día 7.

50 Se recuperó virus rDEN2 del ADNc de p2 tanto en células *Vero* como C6/36, mientras que se recuperó rDEN2 Δ 30 del clon de ADNc p2 Δ 30 solo en células C6/36 (tabla 19). El nivel de virus infeccioso recuperado en células C6/36 era comparable para los clones de ADNc p2 y p2 Δ 30 cuando se sometieron a ensayo mediante titulación de placas e inmunotinción en células *Vero* o C6/36. Tal como se observó anteriormente, la eficacia de la transfección en células C6/36 fue superior a la de células *Vero*. Se recuperaron dos virus rDEN2 Δ 30 a partir de clones de ADNc independientes, n.º 2 y n.º 10.

55 **Tabla 19.** Se recupera virus rDEN2 en células *Vero* y C6/36, pero se recupera virus rDEN2 Δ 30 solo en células C6/36

| Tipo de célula de transfección | Constructo de ADNc | Clon | Virus | Título de virus de la cosecha de transfección (día 7) determinado en el tipo celular indicado (log ₁₀ UFP/ml) | |
|--------------------------------|--------------------|--------|-------------------|--|---------------|
| | | | | Células <i>Vero</i> | Células C6/36 |
| Células <i>Vero</i> | p2 | N.º 8A | rDEN2 | 3,1 | 4,3 |
| | p2 Δ 30 | N.º 2 | rDEN2 Δ 30 | < 0,7 | < 0,7 |
| | p2 Δ 30 | N.º 10 | rDEN2 Δ 30 | < 0,7 | < 0,7 |
| | p2 | N.º 8A | rDEN2 | 5,5 | 7,5 |

| Tipo de célula de transfección | Construido de ADNc | Clon | Virus | Título de virus de la cosecha de transfección (día 7) determinado en el tipo celular indicado (\log_{10} UFP/ml) | |
|--------------------------------|--------------------|--------|-------------------|---|-----|
| Células C6/36 | p2 Δ 30 | N.º 2 | rDEN2 Δ 30 | 4,8 | 7,6 |
| | p2 Δ 30 | N.º 10 | rDEN2 Δ 30 | 4,6 | 7,5 |

Para producir reservas de trabajo de virus rDEN2 y rDEN2 Δ 30, se pasaron las cosechas de transfección y se diluyeron terminalmente en células *Vero*, y se determinaron las secuencias genómicas de los virus. Se diluyó terminalmente la cosecha de transfección en células *Vero* de virus rDEN2 una vez en células *Vero*, y se pasaron clones de virus individuales una vez en células *Vero*. Para evaluar si estaba presente cualquier mutación de adaptación a células *Vero* homóloga identificada en la región NS4B 7100-7200 de rDEN4 en estos clones de virus, se secuenciaron siete clones diluidos terminalmente independientes a lo largo de esta región. Cada uno de los siete virus rDEN2 contenía una sustitución de un único nucleótido en esta región en el nucleótido 7169 (U > C) dando como resultado un cambio de aminoácidos Val > Ala. Este nucleótido corresponde a la mutación 7162 identificada en rDEN4 (Blaney, J. E. *et al.* 2002 *Virology* 300:125-139), que tiene un fenotipo de adaptación a células *Vero* conocido que sugiere que esta mutación puede conferir un fenotipo de potenciación de la replicación en virus rDEN2. Se secuenció completamente un clon de virus rDEN2 y además de la mutación 7169, se encontró una mutación de cambio de sentido (Glu > Ala) en NS5 en el resto 3051 (tabla 20).

Tabla 20. Mutaciones de cambio de sentido que se acumulan en virus rDEN2 y rDEN2 Δ 30 tras la transfección o el pase en células *Vero*

| Virus | Gen | Posición de nucleótido | Sustitución de nucleótidos | Posición de aminoácido ^a | Cambio de aminoácidos |
|--------------------------------|------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| rDEN2 ^b | NS4B | 7169 ^c | U > C | 2358 | Val > Ala |
| (<i>Vero</i>) | NS5 | 9248 | A > C | 3051 | Glu > Ala |
| rDEN2 Δ 30 ^d | NS3 | 4946 | A > G | 1617 | Lys > Arg |
| (<i>Vero</i>) | NS4B | 7169 ^c | U > C | 2358 | Val > Ala |

^a Posición de aminoácido en la poliproteína de DEN2 que comienza con el resto de metionina de la proteína C (nucleótidos 97-99) como posición 1.

^b Se recuperó virus en células *Vero* y se diluyó terminalmente una vez en células *Vero*. Se preparó reserva de virus en células *Vero*.

^c Misma posición de nucleótido que 7162 en rDEN4.

^d Se recuperó virus en células C6/36 y se pasó tres veces en células *Vero*. Entonces se diluyó terminalmente el virus y se preparó una reserva en células *Vero*.

Debido a que los virus tanto rDEN2 como rDEN2 Δ 30 que se hicieron crecer en células *Vero* adquirieron la misma mutación en el nucleótido 7169, que corresponde a la mutación de adaptación de células *Vero* identificada anteriormente en rDEN4 en el nucleótido 7162, se pensó que esta mutación estaba asociada con adaptación al crecimiento de rDEN2 y rDEN2 Δ 30 en células *Vero*. En previsión de que la mutación 7169 pueda permitir que rDEN2 Δ 30 se recupere directamente en células *Vero*, se introdujo la mutación en el plásmido de ADNc de rDEN2 Δ 30 para crear p2 Δ 30-7169. Se sintetizaron transcritos a partir de p2 Δ 30-7169, así como se introdujeron p2 y p2 Δ 30 en células *Vero* o células de mosquito C6/36 usando transfección mediada por liposomas tal como se describió anteriormente. Se recuperó virus rDEN2 Δ 30-7169 a partir del ADNc de p2 Δ 30-7169 tanto en células *Vero* como C6/36, mientras que se recuperó rDEN2 Δ 30 a partir del clon de ADNc p2 Δ 30 solo en células C6/36 (tabla 21). La mutación 7169 es tanto necesaria como suficiente para la recuperación de rDEN2 Δ 30 en células *Vero*.

Tabla 21. El virus rDEN2 Δ 30-7169 que contiene la mutación de adaptación a células *Vero* 7169 se recupera tanto en células *Vero* como C6/36

| Tipo de célula de transfección | Construcción de ADNc | Clon | Virus | Título de virus de la cosecha de transfección (día 14) determinado en células C6/36 (\log_{10} UFP/ml) |
|--------------------------------|----------------------|-----------------|----------------------------|---|
| Células <i>Vero</i> | p2 p2 Δ 30 | N.º 8A N.º 2 | rDEN2 rDEN2 Δ 30 | 6,8 < 0,7 |

| Tipo de célula de transfección | Construcción de ADNc | Clon | Virus | Título de virus de la cosecha de transfección (día 14) determinado en células C6/36 (\log_{10} UFP/ml) |
|--------------------------------|----------------------------------|--------|------------------------|---|
| | p2 Δ 30-7169 ^a | N.º 37 | rDEN2 Δ 30-7169 | 5,1 |
| Células C6/36 | p2 | N.º 8A | rDEN2 | 6,9 |
| | p2 Δ 30 | N.º 2 | rDEN2 Δ 30 | 7,1 |
| | p2 Δ 30-7169 | N.º 37 | rDEN2 Δ 30-7169 | 7,2 |

^a El nucleótido 7169 en rDEN2 corresponde al nucleótido 7162 en rDEN4 que se ha mostrado que está asociado con adaptación al crecimiento en células Vero.

Para evaluar inicialmente la capacidad de la mutación Δ 30 para atenuar el virus rDEN2 en un modelo animal, se evaluó la replicación de los virus DEN2 (Tonga/74), rDEN2 y rDEN2 Δ 30 en ratones SCID-HuH-7. Previamente, se había demostrado que la atenuación de los candidatos a vacuna en ratones SCID-HuH-7 era predictiva de la atenuación en el modelo de infección de mono rhesus (ejemplos 1y 2). Se recuperaron los virus recombinantes sometidos a prueba en este experimento en células C6/36. El aislado de virus DEN2 Tonga/74, rDEN2, y dos virus rDEN2 Δ 30 independientes, (clones 20A y 21A) que se derivaron de dos clones de ADNc p2 Δ 30 independientes, se diluyeron terminalmente dos veces en células C6/36 antes de la producción de una reserva de trabajo en células C6/36. Estos virus no deben contener ninguna mutación de adaptación a células Vero. El virus DEN2 Tonga/74 se replicó a un título de virus medio de 6,2 \log_{10} UFP/ml en el suero de ratones SCID-HuH-7, y el virus rDEN2 se replicó a un nivel similar, 5,6 \log_{10} UFP/ml (tabla 22). Ambos virus rDEN2 Δ 30 estaban restringidos más de 100 veces en su replicación en comparación con el virus rDEN2. Estos resultados indican que la mutación Δ 30 tiene un efecto atenuante sobre la replicación del virus rDEN2 similar al observado para los virus rDEN4 y rDEN1.

Tabla 22. La mutación Δ 30 restringe la replicación del virus rDEN2 en ratones SCID-HuH-7

| Virus | N.º de ratones | Título de virus medio \pm EE (\log_{10} UFP/ml de suero) ^a | Reducción en unidades \log_{10} media con respecto al valor para el tipo natural ^b |
|------------------------------|----------------|--|---|
| DEN2 (Tonga/74) | 8 | 6,2 \pm 0,3 | - |
| rDEN2 | 9 | 5,6 \pm 0,2 | - |
| rDEN2 Δ 30 (clon 20A) | 9 | 3,1 \pm 0,2 | 2,5 |
| rDEN2 Δ 30 (clon 21A) | 9 | 2,9 \pm 0,3 | 2,7 |

^a Se inocularon a grupos de ratones SCID-HuH-7 directamente en el tumor 10^4 UFP de virus que se hicieron crecer en células C6/36. Se recogió suero en el día 7 y se tituló en células C6/36.

^b Comparación de los títulos de virus medios de ratones inoculados con virus mutante y control de rDEN2 simultáneo.

También se determinó la replicación del virus DEN2 en ratones SCID-HuH-7 usando DEN2 (Tonga/74), rDEN2 y rDEN2 Δ 30 que se pasaron en células Vero (véase la tabla 20, notas al pie b y d). Tanto rDEN2 como rDEN2 Δ 30 habían adquirido una mutación en NS4B, nucleótido 7169, que correspondía a la mutación 7162 identificada en rDEN4 como mutación de adaptación a células Vero. En presencia de la mutación 7169, la mutación Δ 30 redujo la replicación de rDEN2 Δ 30 en 1,0 \log_{10} UFP/ml (tabla 23). Previamente, usando virus que se hicieron crecer en células C6/36 y que carecían de la mutación 7169, la mutación Δ 30 redujo la replicación de rDEN2 Δ 30 en aproximadamente 2,5 \log_{10} UFP/ml (tabla 22). Estos resultados indican que la adaptación al crecimiento en células Vero en DEN2 también puede conferir una ligera ventaja de crecimiento en células de hígado HuH-7. No obstante, la atenuación conferida por la mutación Δ 30 todavía puede apreciarse en estos virus adaptados al crecimiento en células Vero.

Tabla 23. La mutación Δ 30 restringe la replicación del virus rDEN2 adaptado a células Vero en ratones SCID-HuH-7

| Virus | N.º de ratones | Título de virus medio \pm EE (\log_{10} UFP/ml de suero) ^a | Reducción en unidades \log_{10} media con respecto al valor para el tipo natural ^b |
|-------------------|----------------|--|---|
| DEN2 (Tonga/74) | 6 | 5,9 \pm 0,3 | - |
| rDEN2 | 7 | 5,9 \pm 0,2 | - |
| rDEN2 Δ 30 | 9 | 4,9 \pm 0,3 | 1,0 |

| Virus | N.º de ratones | Título de virus medio ± EE (log ₁₀ UFP/ml de suero) ^a | Reducción en unidades log ₁₀ media con respecto al valor para el tipo natural ^b |
|-------|----------------|---|---|
|-------|----------------|---|---|

^a Se inocularon a grupos de ratones SCID-HuH-7 directamente en el tumor 10⁴ UFP de virus. Se recogió suero en el día 7 y se tituló en células C6/36.

^b Comparación de los títulos de virus medios de ratones inoculados con control de rDEN2 y rDEN2Δ30.

Se realizó la evaluación de la replicación, inmunogenicidad y eficacia protectora de virus rDEN2Δ30 y rDEN2 original de tipo silvestre en monos rhesus juveniles tal como sigue. Se inyectaron por vía por vía subcutánea a monos seronegativos para el virus del dengue 5,0 log₁₀ UFP de virus en una dosis de 1 ml dividida entre dos inyecciones en cada lado de la zona del hombro superior. Se observaron los monos diariamente y se recogió sangre en los días 0 - 10 y 28 y se almacenó el suero a -70°C. Se pasaron los virus usados en este experimento en células Vero, y los virus recombinantes contenían las mutaciones mostradas en la tabla 20 (véanse las notas al pie b y d). Se determinó el título de virus en muestras de suero mediante ensayo de placas en células Vero tal como se describió anteriormente (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Se determinaron los títulos de neutralización por reducción de placas para las muestras de suero del día 28 tal como se describió anteriormente (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Se expusieron todos los monos en el día 28 a una única dosis de 5,0 log₁₀ UFP de DEN2 de tipo natural (Tonga/74) y se recogió sangre durante 10 días. Se determinó el título de virus en sueros tras la exposición mediante ensayo de placas en células Vero. Los monos a los que se les inoculó DEN2 de tipo natural (Tonga/74) o rDEN2 fueron virémicos durante 4-5 días con un título pico medio de 2,1 o 1,9 log₁₀ UFP/ml, respectivamente.

Los monos a los que se les inoculó rDEN2Δ30 fueron virémicos durante 2 - 3 días con un título de pico medio de 1,7 log₁₀ UFP/ml (tabla 24, figura 7), lo que indica que la mutación Δ30 puede atenuar DEN2, aunque no al mismo bajo nivel observado en rDEN1Δ30 (tabla 16). Tal como se esperaba para un virus atenuado, la respuesta inmunitaria, tal como se midió mediante el título de anticuerpos neutralizantes, era inferior tras la inoculación con rDEN2Δ30 en comparación con la inoculación con DEN2 de tipo natural (Tonga/74) o rDEN2 (tabla 24), aunque suficientemente alta para proteger a los animales frente a la exposición al virus DEN2 de tipo natural (tabla 25). Por tanto, la disminución del número de días de viremia para rDEN2Δ30, la disminución del título pico medio y la disminución de la respuesta de anticuerpos séricos indica que la mutación Δ30 atenúa rDEN2 para monos rhesus.

Tabla 24. rDEN2Δ30 está ligeramente más atenuado para monos rhesus que rDEN2

| Virus ^a | N.º de monos | N.º de monos con viremia | N.º medio de días virémicos por mono ^b | Título de virus pico medio (log ₁₀ UFP/ml ± EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|--------------------|--------------|--------------------------|---|--|---|--------|
| | | | | | Día 0 | Día 28 |
| simulado | 2 | 0 | 0 | <0,7 | <10 | <10 |
| DEN2 (Tonga/74) | 4 | 4 | 4,5 | 2,1 ± 0,3 | <10 | 311 |
| rDEN2 (Vero) | 4 | 4 | 4,0 | 1,9 ± 0,1 | <10 | 173 |
| rDEN2Δ30 (Vero) | 4 | 4 | 2,8 | 1,7 ± 0,2 | <10 | 91 |

^a Se inocularon a grupos de monos rhesus por vía subcutánea con 10⁵ UFP del virus indicado en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días de 0 a 6, 8, 10, 12 y 28. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

^b No se detectó viremia en ningún mono tras el día 8.

Tabla 25. rDEN2 Δ 30 protege a monos rhesus frente a la exposición al virus DEN2 de tipo natural

| Virus ^a | N.º de monos | N.º medio de días virémicos por mono tras la exposición a DEN2 | Título de virus pico medio (\log_{10} UFP/ml \pm EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|--------------------------|--------------|--|---|---|--------|
| | | | | Día 28 | Día 56 |
| Simulada | 2 | 4,0 | 2,1 \pm 0,1 | <10 | 338 |
| DEN2 (Tonga/ 74) | 4 | 0 | <0,7 | 311 | 334 |
| rDEN2 (Vero) | 4 | 0 | <0,7 | 173 | 318 |
| rDEN2 Δ 30 (Vero) | 4 | 0 | <0,7 | 91 | 267 |

^a 28 días tras la inoculación con los virus indicados, se expusieron los monos por vía subcutánea a 10^5 UFP de DEN2 (Tonga/74) en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días de 28 a 34, 36, 38 y 56. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

Se evaluó la infectividad de DEN2 (Tonga/74), rDEN2 y rDEN2 Δ 30 para mosquitos *Aedes aegypti* por medio de una harina de sangre artificial usando los métodos descritos en detalle en el ejemplo de referencia 3. Sin embargo, a dosis de 3,3 a 3,5 \log_{10} UFP ingeridas, ninguno de estos tres virus infectó a ningún mosquito, lo que indica que DEN2 (Tonga/74) es escasamente infeccioso para *Aedes aegypti*. Como con rDEN1, queda por definir la base genética para esta falta de infectividad. La importante propiedad de infectividad restringida para el intestino medio del mosquito es sumamente deseable en un candidato a vacuna porque serviría para restringir en gran medida la transmisión del virus desde un vacunado hasta un vector de mosquito.

Varias mutaciones de cambio de sentido identificadas en rDEN4 han demostrado conferir una replicación atenuada en cerebro de ratón lactante y/o ratones SCID-HuH-7 (Blaney, J. E. *et al.* 2002 *Virology* 300:125-139; Blaney, J. E. *et al.* 2001 *J Virol* 75:9731-9740). Además, se han caracterizado mutaciones de cambio de sentido que potencian las replicación de virus rDEN4 en células Vero. La conservación de secuencia significativa entre los serotipos de virus DEN proporciona una estrategia mediante la cual se contempla que las mutaciones identificadas en virus rDEN4 se usen para conferir fenotipos similares en virus rDEN2. Seis mutaciones identificadas en virus rDEN4 que están en un sitio conservado en virus rDEN2 van a introducirse en los clones de ADNc p2 y p2 Δ 30 (tabla 26). Específicamente, van a evaluarse dos mutaciones de rDEN4, NS3 4891 y 4995, que confieren fenotipos de adaptación de células Vero y replicación disminuida en cerebro de ratón, una mutación, NS4B 7182, que confiere un fenotipo de adaptación de células Vero, y tres mutaciones, NS1 2650, NS3 5097 y 3'-UTR 10634 que confieren replicación disminuida en cerebro de ratón y ratones SCID-HuH-7. Se han introducido estas mutaciones en fragmentos subclonados de los clones de ADNc p2 y p2 Δ 30, y se han usado para generar clones de ADNc de longitud completa mutantes (tabla 26), a partir de los cuales se han recuperado virus en células C6/36 (tabla 27). Se contempla que la evaluación de estos virus rDEN2 mutantes determina que tales mutaciones puntuales pueden transportarse a un serotipo de virus DEN diferente y confiere un fenotipo útil similar, tal como se ha demostrado para la mutación por delección Δ 30.

Tabla 26. Introducción de mutaciones puntuales conservadas caracterizadas en virus rDEN4 en virus rDEN2 Tonga/74

| Fenotipo en virus rDEN4 | | | Mutación en virus rDEN4 | | | Mutación introducida en virus DEN2 | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--|
| Adaptación a Vero ^a | att ^b en cerebro de ratón | att ^c en SCID-HuH-7 | Gen / región | Posición de nucleótido | Posición de aminoácido ^d | Cambio de aminoácidos | Posición de nucleótido | Posición de aminoácido ^d | Cambio de aminoácidos | Sitio de ER / región mutagénica ^e |
| + | + | - | NS3 | 4891 | 1597 | Ile > Thr | 4889 | 1598 | Ile > Thr | Nar CCAcgGGcGCCCGT |
| + | + | - | NS3 | 4995 | 1632 | Ser > Pro | 4993 | 1633 | Ser > Pro | Stu I AAGGccTGGA |
| + | - | - | NS4b | 7182 | 2361 | Gly > Ser | 7189 | 2365 | Gly > Ser | Xma I TATccCCGGGAC |
| - | + | + | NS1 | 2650 | 850 | Asn > Ser | 2648 | 851 | Asn > Ser | Sac I AGAgcTctcTC |
| - | + | + | NS3 | 5097 | 1666 | Asp > Asn | 5095 | 1667 | Asp > Asn | Xma GaATCTCCACCCcGGA |
| - | + | + | 3'-UTR | 10634 | n/a ^f | n/a | 10698 | n/a | n/a | ninguno CTGTcGAATC |

^a La presencia de la mutación indicada aumenta el tamaño de las placas en células Vero dos veces o más que el virus rDEN4.

^b La presencia de la mutación indicada restringe la replicación en cerebro de ratón de 7 días de edad más de 100 veces en comparación con el virus rDEN4.

^c La presencia de la mutación indicada restringe la replicación en ratones SCID-HuH-7 más de 100 veces en comparación con el virus rDEN4.

^d Posición de aminoácido en la poliproteína de DEN4 o DEN2 que comienza con el resto de metionina de la proteína C (nucleótidos 102-104 ó 97-99, respectivamente) como posición 1.

^e Se diseñaron por ingeniería genética cebadores que introdujeron (parte subrayada) sitios de enzimas de restricción (ER) silenciosos en la traducción. Las letras minúsculas indican cambios de nt y las letras en negrita indican el sitio de la mutación 5-FU, que en algunos oligonucleótidos difiere del cambio por sustitución de nucleótidos original con el fin de crear un sitio de ER único. El cambio conserva el codón para la sustitución de aminoácidos.

^f La sustitución de nucleótidos en la 3'-UTR es U > C en el virus DEN4 y DEN2.

Tabla 27. Se recuperan virus rDEN2 que contienen mutaciones 5-FU conservadas en células C6/36

| Virus (posición de nucleótido en rDEN2) | Posición de nucleótido en rDEN4 | Título de virus de la cosecha de transfección (día 7) determinado en células C6/36 (log ₁₀ UFP/ml) |
|---|---------------------------------|---|
| rDEN2-4889 | 4891 | 7,6 |
| rDEN2-4993 | 4995 | 7,2 |
| rDEN2-7189 | 7182 | 3,5 |
| rDEN2-2648 | 2650 | ^a – |
| rDEN2-5095 | 5097 | ^a – |
| rDEN2-10698 | 10634 | 7,7 |

^a Todavía no se ha intentado la transfección.

EJEMPLO COMPARATIVO 4

5

Generación y caracterización de un virus DEN3 recombinante que contiene la mutación $\Delta 30$

10

Debido a que rDEN1 $\Delta 30$ se atenuó satisfactoriamente, los presentes inventores buscaron extender esta tecnología a la creación de un candidato a vacuna contra DEN3. Para hacer esto, se introdujo la mutación $\Delta 30$ en el ADNc de DEN3, de manera similar al método usado para crear rDEN2 $\Delta 30$. Se escogió un aislado de virus DEN3 de una epidemia de dengue de 1978 en la zona rural de Sleman, Indonesia Central (Sleman/78) (Gubler, D. J. *et al.* 1981 Am J Trop Med Hyg 30:1094-1099) para representar DEN3 de tipo silvestre. Se secuenció el genoma de DEN3 (Sleman/78) en su totalidad y sirvió como secuencia consenso para la construcción de un clon de ADNc de longitud completa (apéndice 2). Se generaron fragmentos de ADNc de DEN3 (Sleman/78) mediante transcripción inversa del genoma tal como se indica en la figura 8A. Se subclonó cada fragmento en un vector de plásmido y se secuenció para verificar que coincidía con la secuencia consenso tal como se determinó por el virus. Esto produjo seis fragmentos de ADNc clonados que abarcaban el genoma. Se modificaron los fragmentos clonados tal como sigue: el fragmento 5, que representa el extremo 5' del genoma se puso colindante al promotor de SP6 precedido por un sitio de restricción *Ascl*; se modificó el fragmento 1L para que contuviese un sitio de restricción *SpeI* silencioso en la traducción en el nucleótido genómico 2345; se modificó el fragmento 1R para que contuviese un sitio de restricción *SpeI* silencioso en la traducción también en el nucleótido genómico 2345, y para estabilizar el clon de longitud completa final, se crearon tres mutaciones silenciosas en la traducción en los nucleótidos 2354 - 2356, 2360 - 2362 y 2399 para garantizar que estaban presentes codones de terminación de la traducción en todos los marcos de lectura distintos de los usados para sintetizar la poliproteína de virus; se modificó el fragmento 3 en el nucleótido 9007 para suprimir un sitio de restricción *KpnI* que se produce de manera natural; y el fragmento 4, que representa el extremo 3' del genoma se puso colindante a un sitio de restricción *KpnI*. Se añadió cada fragmento progresivamente entre los sitios de restricción *Ascl* y *KpnI* del clon de ADNc de DEN4 p4 (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) para generar un clon de ADNc de DEN3 de longitud completa con los mismos antecedentes de vector usados satisfactoriamente para generar rDEN4 y rDEN2. Sin embargo, no pudo recuperarse un clon estable, de longitud completa, en *E. coli* cuando se combinaron los fragmentos 1L y 1R en la misma molécula de ADNc. Para superar esta inestabilidad, se introdujo un enlazador de ADN sintético (figura 8A) que contenía codones de terminación redundantes en cada uno de los marcos de lectura abiertos directos e inversos en el sitio de restricción *SpeI* al mismo tiempo que se añadía el fragmento 1L para completar el constructo de ADNc de longitud completa. El clon p3 resultante que contenía la secuencia de enlazador era estable en *E. coli*, lo que indica que la secuencia de enlazador era suficiente para interrumpir cualquier elemento perjudicial que exista en esta región. Se secuenció el clon p3 de ADNc y se encontró que el genoma del virus coincidía con la secuencia consenso de DEN3 (Sleman/78), con la excepción de la secuencia de enlazador y las modificaciones silenciosas en la traducción indicadas anteriormente (apéndice 2 – se muestra con la secuencia de enlazador eliminada). Se introdujo la mutación $\Delta 30$ en el fragmento 4 para generar el fragmento 4 $\Delta 30$. Para crear p3 $\Delta 30$, se reemplazó la región del fragmento 4 de p3 por el fragmento 4 $\Delta 30$ (figura 8A, B).

40

45

Para la transcripción y generación de virus infeccioso, se digirieron los plásmidos de ADNc p3 y p3 $\Delta 30$ con *SpeI* y se volvieron a ligar para eliminar la secuencia de enlazador, se linealizaron con *Acc65I* (isoesquímico de *KpnI* que escinde dejando solo un único nucleótido en 3'), y se usaron como moldes en una reacción de transcripción usando ARN polimerasa SP6 tal como se describió anteriormente (Blaney, J. E. *et al.* 2002 Virology 300:125-139). Se introdujeron transcritos en células *Vero* o células de mosquito C6/36 usando transfección mediada por liposomas y se recogieron sobrenadantes de cultivo celular en el día 14.

50

Se recuperó el virus rDEN3 a partir del ADNc p3 tanto en células *Vero* como C6/36, mientras que rDEN3 $\Delta 30$ se recuperó a partir del clon de ADNc p3 $\Delta 30$ solo en células C6/36 (tabla 28). El nivel de virus infeccioso recuperado en

células C6/36 era comparable para los clones de ADNc p3 y p3Δ30 cuando se sometieron a ensayo mediante titulación de placas en células Vero o C6/36. Tal como se observó anteriormente, la eficacia de transfección en células C6/36 era mayor que en células Vero. Se recuperaron dos virus rDEN3Δ30 a partir de clones de ADNc independientes, n.º 22 y n.º 41.

5

Tabla 28. El virus rDEN3 se recupera en células Vero y C6/36, pero el virus rDEN3Δ30 solo se recupera en células C6/36.

| Tipo de célula de transfección | Construido de ADNc | Clon | Virus | Título de virus de la cosecha de transfección (día 14) determinado en el tipo celular indicado (log ₁₀ UFP/ml) | |
|--------------------------------|--------------------|--------|----------|---|---------------|
| | | | | Células Vero | Células C6/36 |
| Células Vero | p3 | n.º 50 | rDEN3 | 5,2 | 6,3 |
| | p3Δ30 | n.º 22 | rDBN3Δ30 | <0,7 | < 0,7 |
| | p3Δ30 | n.º 41 | rDEN3Δ30 | < 0,7 | < 0,7 |
| Células C6/36 | p3 | n.º 50 | rDEN3 | 5,2 | 6,0 |
| | p3Δ30 | n.º 22 | rDEN3Δ30 | 5,9 | 6,9 |
| | p3Δ30 | n.º 41 | rDEN3Δ30 | 5,1 | 7,2 |

- 10 Para producir reservas de trabajo de virus, se pasarán las cosechas de transfección y se diluirán terminalmente en células Vero, y se determinarán las secuencias genómicas de los virus. Para mejorar el rendimiento de virus en células Vero, se introdujo la mutación de adaptación de células Vero previamente identificada en rDEN4 en el nucleótido 7162 en la región NS4B homóloga de p3 y p3Δ30 para crear p3-7164 y p3Δ30-7164. Esta mutación crea una sustitución de Val por Ala en la posición de aminoácido 2357. Tal como se demuestra para rDEN2Δ30, esta mutación permitía la recuperación directa del virus en células Vero (tabla 27) y se prevé que tenga el mismo efecto para rDEN3Δ30.

- 15 Para evaluar inicialmente la capacidad de la mutación Δ30 para atenuar el virus rDEN3 en un modelo animal, se evaluará la replicación de los virus DEN3 (Sleman/78), rDEN3 y rDEN3Δ30 en ratones SCID-HuH-7 y monos rhesus. Previamente, se ha demostrado que la atenuación de los candidatos a vacuna en ratones SCID-HuH-7 es predictiva de la atenuación en el modelo de infección de mono rhesus (ejemplos 1 y 2). Se contempla que la evaluación de estos virus rDEN3 mutantes determine que las mutaciones por delección Δ30 pueden transportarse al serotipo de virus DEN3 y conferir un fenotipo útil similar, tal como se ha demostrado para DEN1, DEN2 y DEN4.

- 25 En resumen, la estrategia de introducción de la mutación Δ30 en los virus DEN de tipo natural de cada serotipo para generar una formulación de vacuna tetravalente adecuadamente atenuada es un enfoque único y atractivo por varios motivos. En primer lugar, la mutación responsable de la atenuación es una delección de 30 nucleótidos en la 3'-UTR, garantizando así que todas las proteínas estructurales y no estructurales expresadas por cada uno de los cuatro componentes de la vacuna tetravalente son proteínas de tipo silvestre auténticas. Tales proteínas de tipo silvestre deben provocar una respuesta de anticuerpos que es de base amplia, en lugar de basada únicamente en las proteínas M y E que están presentes en candidatos a vacuna contra el virus del dengue quiméricos (Guirakhoo, F. *et al.* 2001 J Virol 75: 7290-304; Huang, C.Y. *et al.* 2000 J Virol 74:3020-8). Las singularidad de este enfoque deriva del hecho de que otras vacunas contra el virus del dengue atenuadas vivas tienen mutaciones en sus proteínas estructurales o no estructurales (Butrapet, S. *et al.* 2000 J Virol 74:3011-9; Puri, B. *et al.* 1997 J Gen Virol 78:2287-91), por tanto la respuesta inmunitaria inducida por estos virus será frente a una proteína mutante, en lugar de frente a una proteína de tipo silvestre. En segundo lugar, las mutaciones por delección son genéticamente más estables que las mutaciones puntuales, y la reversión del fenotipo de atenuación es improbable. En seres humanos, DEN4Δ30 presente en el suero de los vacunados conservaba su mutación Δ30, confirmando su estabilidad genética *in vivo* (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Las mutaciones atenuantes en otros candidatos a vacuna de atenuados vivos contra el dengue se basan en mutaciones puntuales menos estables (Butrapet, S. *et al.* 2000 J Virol 74:3011-9; Puri, B. *et al.* 1997 J Gen Virol 78:2287-91). En tercer lugar, puesto que la mutación Δ30 es común a cada uno de los cuatro virus de la vacuna tetravalente, la recombinación entre cualquiera de los cuatro serotipos de vacuna no conduciría a una pérdida de la mutación atenuante o reversión a un fenotipo de tipo silvestre. Se ha observado recombinación entre componentes de la vacuna de la polio trivalente (Guillot, S. *et al.* 2000 J Virol 74: 8434-43), y se han descrito virus del dengue recombinantes que se producen de manera natural (Worobey, M. *et al.* 1999 PNAS USA 96:7352-7), lo que indica la capacidad de este flavivirus para intercambiar elementos genéticos entre dos virus diferentes. Claramente, el intercambio de genes se logra fácilmente entre diferentes serotipos de virus DEN usando técnicas de ADNc recombinante (Bray, M. y Lai, C.J. 1991 PNAS USA 88:10342-6). En cuarto lugar, los virus con proteínas estructurales de tipo natural parecen ser más infecciosos que los virus con proteínas estructurales alteradas (Huang, C.Y. *et al.* 2000 J Virol 74:3020-80). Esto permite el uso de una baja cantidad de

cada uno de los cuatro componentes de virus en la vacuna final, contribuyendo al bajo coste de fabricación. La fabricación de bajo coste es un elemento esencial para definir la utilidad final de una vacuna contra el virus del dengue.

5 EJEMPLO 5

Generación y caracterización de virus DEN2 quiméricos intertípicos que contienen la mutación $\Delta 30$

Los cuatro serotipos de virus del dengue se definen por respuestas de anticuerpos inducidas por las proteínas estructurales del virus, principalmente por una respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína de la envoltura (E). Estas proteínas estructurales incluyen la glicoproteína E, una proteína de membrana (M), y una proteína de la cápsida (C). La partícula de virus maduro consiste en una vaina proteica externa bien organizada que rodea a una membrana de bicapa lipídica y un núcleo de nucleocápsida interna peor definida (Kuhn, R.J. *et al.* 2002 Cell 108:717-25). La glicoproteína E es el antígeno protector principal e induce fácilmente anticuerpos neutralizantes del virus que confieren protección frente a infección por virus del dengue. Una vacuna contra el dengue eficaz debe contener por tanto mínimamente la proteína E de los cuatro serotipos, concretamente DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, induciendo de ese modo amplia inmunidad y descartando la posibilidad de desarrollar las enfermedades más graves, FHD/SCD, que se producen en seres humanos durante la infección secundaria con un virus del dengue de tipo silvestre heterotípico. Basándose en una estrategia notificada previamente (Bray, M. y Lai, C.J. 1991 PNAS USA 88:10342-6), se está usando una tecnología de ADNc recombinante para desarrollar una vacuna contra el virus del dengue tetravalente atenuada de un conjunto de virus del dengue quiméricos intertípicos que portan las proteínas estructurales de cada serotipo.

Tras la identificación de un virus recombinante DEN4 inmunogénico y adecuadamente atenuado, concretamente DEN4A30 (Durbin, A.P *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13), se han generado virus quiméricos basándose en el ADNc de DEN4 en los que los genes C-M-E (CME) o M-E (ME) se han reemplazado por los genes correspondientes derivados de la cepa de Nueva Guinea C (NGC) de DEN2 prototípica (figura 9A). Para crear los virus quiméricos de CME, se reemplazó la región *BglII* / *XhoI* del ADNc o bien para rDEN4 o bien para rDEN4 Δ 30 por una región similar derivada de DEN2. Igualmente, para crear los virus quiméricos de ME, se reemplazó la región *PstI* / *XhoI* del ADNc o bien para rDEN4 o bien para rDEN4 Δ 30 por una región homóloga derivada de DEN2. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las uniones resultantes se muestran en la figura 9B. El número de registro de GenBank para la secuencia de nucleótidos de rDEN4 Δ 30 es AF326837. El número de registro de GenBank para DEN2 NGC es M29095, que representa la cepa neurovirulenta de ratón de DEN2 NGC y difiere de la cepa prototípica usada en este caso tal como se documentó previamente (Bray, M. *et al.* 1998 J Virol 72:1647-51).

Para la transcripción y generación de virus, se linealizaron clones de ADNc quiméricos y se usaron como molde en una reacción de transcripción usando ARN polimerasa SP6 tal como se describe (Durbin, A.P *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Se introdujeron transcritos en células Vero usando transfección mediada por liposomas y se recogió virus del dengue recombinante en el día 7. Se confirmaron los genomas de los virus resultantes mediante análisis de secuencia del ARN viral aislado a partir de virus recuperado tal como se describió previamente (Durbin, A.P *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Se identificaron mutaciones imprevistas que surgieron del pase del virus en cultivo tisular en todos los virus y se enumeran en la tabla 29. Particularmente, cada virus contenía una mutación de cambio de sentido en NS4B correspondiente a una mutación identificada previamente a partir de rDEN4 y asociada con adaptación a la replicación en células Vero (véase la tabla 30 para la correlación de las posiciones de nucleótido entre rDEN4 y virus quiméricos). Todos los virus se replicaban en células Vero a títulos en exceso de 6,0 log₁₀ UFP/ml, lo que indica que los virus quiméricos, incluso los que contenían la mutación $\Delta 30$, se replican eficazmente en cultivo celular, una propiedad esencial para la fabricación de la vacuna.

Tabla 29. Mutaciones de cambio de sentido observadas entre los virus DEN2/4 quiméricos que se hacen crecer en células Vero

| Virus | Gen | Posición de nucleótido | Cambio de nucleótidos | Posición de aminoácido | Cambio de aminoácidos |
|---------------------------|------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| rDEN2/4(CME) | NS4B | 7161 ^a | A > U | 2355 | Leu > Phe |
| rDEN2/4 Δ 30 (CME) | M | 743 | G > A | 216 | Gly > Glu |
| | E | 1493 | C > U | 466 | Ser > Phe |
| | NS4B | 7544 ^b | C > T | 2483 | Ala > Val |
| rDEN2/4(ME) | E | 1065 | U > C | 322 | Phe > Leu |
| | NS4B | 7163 ^a | A > U | 2354 | Leu > Phe |
| rDEN2/4 Δ 30(ME) | NS4B | 7163 ^a | A > C | 2354 | Leu > Phe |

| Virus | Gen | Posición de nucleótido | Cambio de nucleótidos | Posición de aminoácido | Cambio de aminoácidos |
|-------|-----|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|-------|-----|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|

^aMisma posición de nucleótido que 7163 en rDEN4.

^bMisma posición de nucleótido que 7546 en rDEN4.

Tabla 30. Diferencias de longitud de nucleótidos (nt) para virus quiméricos DEN en comparación con rDEN4.

| Virus quimérico rDEN | Diferencia de nt con respecto a rDEN4 (tras la región de CME) | Inicio del ORF (posición de nt) | Longitud de aminoácidos | | |
|----------------------|---|---------------------------------|-------------------------|-----|-----|
| | | | C | M | E |
| 1/4 ME | 0 | 102 | 113 | 166 | 495 |
| 1/4 CME | +3 | 102 | 114 | 166 | 495 |
| 2/4 ME | 0 | 102 | 113 | 166 | 495 |
| 2/4 CME | -2 | 97 | 114 | 166 | 495 |
| 3/4 ME | -6 | 102 | 113 | 166 | 493 |
| 3/4 CME | -3 | 102 | 114 | 166 | 493 |
| rDEN4 | - | 102 | 113 | 166 | 495 |

- 5 Los resultados de un estudio de seguridad, inmunogenicidad y eficacia en monos se presentan en la tabla 31. Los monos a los que se les inoculó DEN2 de tipo natural fueron virémicos durante aproximadamente 5 días con un título de pico medio de 2,1 log₁₀ UFP/ml, mientras que los monos a los que se les inoculó cualquiera de los virus DEN2 quiméricos fueron virémicos durante 1,2 días o menos y tuvieron un título de pico medio inferior a 1,0 log₁₀ UFP/ml. Esta reducción en la magnitud y la duración de la viremia indica claramente que los virus quiméricos que contienen las proteínas o bien CME o bien de DEN2 estaban más atenuados que el virus DEN2 NGC original. Ni los animales que recibieron los virus DEN2 de tipo natural ni los que recibieron virus quiméricos DEN2/4 estaban enfermos. La disminución de la replicación de los virus atenuados en monos va acompañada por una reducción en la respuesta inmunitaria de monos inoculados. Esto se indica en la tabla 31 mediante aproximadamente una reducción de 5 veces en el nivel de anticuerpos neutralizantes tras la inoculación con los virus quiméricos en comparación con los títulos logrados en animales a los que se les inoculó el virus de tipo natural. La adición de la mutación Δ30 al virus quimérico de CME atenuó adicionalmente el virus, de manera que rDEN2/4Δ30(CME) no se replicaba en monos en un nivel detectable y no inducía una respuesta inmunitaria detectable. Este virus parecía estar sobreatenuado, y si se observaran resultados similares en seres humanos, este virus no sería adecuado para su uso como vacuna. Sin embargo, la adición de la mutación Δ30 al virus quimérico de ME no atenuó adicionalmente este virus quimérico y el virus rDEN2/4Δ30(ME) resultante parece estar atenuado satisfactoriamente y ser inmunogénico para su uso como vacuna.

Tabla 31. La quimerización entre los tipos 2 y 4 de virus del dengue da como resultado virus recombinantes que están atenuados para monos rhesus.

| Grupo* | Virus | n | N.º medio de días con viremia | Título de virus pico medio (log ₁₀ ufp/ml) | Título de anticuerpos neutralizantes, media geométrica (recíproca) |
|--------|------------------|---|-------------------------------|---|--|
| 1 | rDEN2/4 (CME) | 6 | 1,2 | 0,9 | 50 |
| 2 | rDEN2/4Δ30 (CME) | 8 | 0 | <0,7 | <5 |
| 3 | rDEN2/4 (ME) | 4 | 1,0 | 0,8 | 76 |
| 4 | rDEN2/4Δ30 (ME) | 4 | 0,3 | 0,7 | 62 |
| 5 | DEN2 NGC | 6 | 5,5 | 2,1 | 312 |

* Se inocularon a monos rhesus por vía subcutánea 5,0 log₁₀ UFP de virus. Se recogieron muestras de suero diariamente durante 10 días. Se recogió suero para el ensayo de neutralización en el día 28. Las muestras de suero obtenidas antes de la inoculación del virus tenían un título de anticuerpos neutralizantes de <5.

Tal como se describió en los ejemplos anteriores, los ratones SCID a los que se han trasplantado células HuH-7 son un modelo sensible para la evaluación de la atenuación del virus del dengue. Cada virus DEN2/4 quimérico se inoculó en grupos de ratones SCID-HuH-7 y se determinaron los niveles de virus en el suero (tabla 32). Los virus quiméricos se replicaron hasta niveles entre 20 y 150 veces inferiores que cualquiera de los virus originales (rDEN4 y DEN2-NGC). Los virus quiméricos de CME estaban ligeramente más atenuados que los virus quiméricos de ME comparables, proporcionando la mutación Δ30 a una reducción en la replicación de 0,5 log₁₀. Este nivel de atenuación ejercido por la mutación Δ30 era similar al observado previamente para rDEN4Δ30.

Tabla 32. La quimerización entre los tipos 2 y 4 del virus del dengue da como resultado virus recombinantes que están atenuados para ratones HuH-7-SCID.

| Virus ^a | N.º de ratones | Título de virus pico medio (log ₁₀ ufp/ml ± EE) | Grupo estadístico ^b |
|--------------------|----------------|--|--------------------------------|
| rDEN4 | 32 | 6,3 ± 0,2 | A |
| DEN2-NGC | 9 | 6,1 ± 0,2 | A |
| rDEN2/4 (CME) | 7 | 4,4 ± 0,3 | B |
| rDEN2/4Δ30 (CME) | 7 | 3,9 ± 0,3 | B |
| rDEN2/4 (ME) | 6 | 4,8 ± 0,5 | B |
| rDEN2/4Δ30 (ME) | 9 | 4,3 ± 0,2 | B |

^aSe inocularon a grupos de ratones HuH-7-SCID en el tumor 4,0 log₁₀ UFP del virus indicado. Se recogió suero en el día 7 y se determinó el título de virus en células Vero.

^bLos títulos pico medios se asignaron a grupos estadísticos usando la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey (P < 0,05). Los grupos con la misma designación de letra no son significativamente diferentes.

Para evaluar los niveles de replicación de cada virus quimérico DEN2/4 en mosquitos, se infectaron experimentalmente dos géneros diferentes de mosquitos. Se infectaron *Aedes aegypti* mediante ingestión de una harina de sangre que contenía virus. Evaluando la presencia de antígeno de virus tanto en tejido de cabeza como de intestino medio, pudo determinarse la infectividad para los tejidos localizados (intestino medio), y también pudo medirse la capacidad del virus para diseminarse y replicarse en tejidos más allá de la barrera del intestino medio (cabeza). La presencia de virus en la cabeza se ve limitada por la capacidad del virus ingerido para replicarse en el intestino medio y luego diseminarse hasta las glándulas salivares en la cabeza, así como la capacidad innata del virus para replicarse en las glándulas salivares. La inoculación intratorácica de virus en *Toxorhynchites splendens* evita la barrera del intestino medio del mosquito. Los virus originales rDEN4 y DEN2-NGC infectan fácilmente *Ae. aegypti* y *T. splendens* (tabla 33), pareciendo ser DEN2-NGC mucho más infeccioso en *T. splendens*. Cada uno de los virus quiméricos rDEN2/4 se sometió también a prueba en ambos tipos de mosquito. En muchos casos no fue posible inocular a *Ae. aegypti* una reserva de virus sin diluir de título suficiente para lograr una infección detectable debido a la muy baja infectividad de varios de los virus. No obstante, está claro que los virus quiméricos rDEN2/4 son menos infecciosos para el intestino medio y la cabeza. Los virus originales rDEN4 y DEN2-NGC, administrados a una dosis máxima de aproximadamente 4,0 log₁₀ UFP, eran detectables en el 74% y el 94% de las preparaciones de intestino medio, y el 32% y el 71% de las preparaciones de cabeza, respectivamente. Entre los virus quiméricos, el nivel más alto de infectividad, tal como se observa para rDEN2/4Δ30(CME), dio como resultado solo el 26% de muestras de intestino medio infectadas y el 6% de muestras de cabeza. En el *T. splendens* más permisivo, los virus quiméricos rDEN2/4 fueron generalmente menos infecciosos que cualquier virus original, siendo los virus quiméricos de CME menos infecciosos que los virus de ME. Previamente se ha notificado para DEN4 que la mutación Δ30 no tiene un efecto apreciable sobre la infectividad de virus en *T. splendens* similar al observado en este caso para los virus quiméricos rDEN2/4 (Troyer, J.M. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:414-419).

Tabla 33. Los virus quiméricos del dengue 2/4 son menos infecciosos en comparación con cualquier cepa de virus parental en mosquitos

| Virus | <i>Toxorhynchites splendens</i> (inoculación intratorácica) | | | <i>Aedes aegypti</i> (infección oral) | | | |
|-------|---|-----------------------|------------------------------|--|-----------------------|------------------------------|--------|
| | Dosis ^a log ₁₀ ufp | N.º sometido a prueba | % de infectados ^b | Dosis ^c log ₁₀ ufp | N.º sometido a prueba | % de infectados ^d | |
| | | | | | | Intestino medio | Cabeza |
| | | | | | | | |

| Virus | <i>Toxorhynchites splendens</i> (inoculación intratorácica) | | | <i>Aedes aegypti</i> (infección oral) | | | |
|----------------------|--|-----------------------------|------------------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Dosis ^a log ₁₀ ufp | N.º sometido a prueba | % de infectados ^b | Dosis ^c log ₁₀ ufp | N.º sometido a prueba | % de infectados ^d | |
| | | | | | | Intestino medio | Cabeza |
| rDEN4 | 3,3 | 6 | 83 | 3,8 | 38 | 74 | 32 |
| | 2,3 | 7 | 57 | 2,8 | 15 | 26 | 6 |
| | 1,3 | 6 | 0 | 1,8 | 20 | 10 | 5 |
| | | | DMI₅₀ = 2,2 | | | DMI₅₀ = 3,4 | DMI₅₀ ≥ 4,1 |
| DEN2-NGC | 2,5 | 5 | 100 | 4,0 | 17 | 94 | 71 |
| | 1,2 | 15 | 93 | 3,0 | 25 | 36 | 16 |
| | 0,2 | 4 | 75 | 2,0 | 30 | 0 | 0 |
| | 0,02 | 8 | 38 | | | DMI₅₀ = 3,2 | DMI₅₀ = 3,6 |
| | | | DMI₅₀ = 0,5 | | | | |
| rDEN2/4 (CME) | 3,9 | 9 | 11 | 4,4 | 11 | 9 | 0 |
| | 2,9 | 5 | 0 | 3,4 | 10 | 0 | 0 |
| | | | DMI₅₀ ≥ 4,3 | | | DMI₅₀ ≥ 4,9 | Nc^e |
| rDEN2/ 4Δ30 (CME) | 3,5 | 6 | 17 | 4,0 | 15 | 26 | 6 |
| | 2,5 | 6 | 17 | 3,0 | 10 | 0 | 0 |
| | | | DMI₅₀ ≥ 3,9 | | | DMI₅₀ ≥ 4,3 | DMI₅₀ ≥ 4,5 |
| rDEN2/4 (ME) | 3,4 | 6 | 100 | 3,9 | 23 | 4 | 0 |
| | 2,4 | 5 | 20 | | | DMI₅₀ ≥ 4,4 | Nc |
| | 1,4 | 5 | 0 | | | | |
| | | | DMI₅₀ = 2,8 | | | | |
| rDEN2/4Δ30 (ME) | 2,6 | 11 | 9 | 3,1 | 30 | 0 | 0 |
| | | | DMI₅₀ ≥ 3,0 | | | Nc | Nc |

^a Cantidad de virus presente en 0,22 µl de inóculo.

^b Porcentaje de mosquitos con antígeno detectable por IFA en tejido de cabeza preparado 14 días tras la inoculación.

^c Título de virus ingerido, suponiendo un una harina de sangre de 2 µl.

^d Porcentaje de mosquitos con antígeno detectable por IFA en tejido de cabeza o intestino medio preparado 21 días tras la infección oral. Cuando se detectó infección por virus, pero no superaba una frecuencia del 50% a la dosis más alta de virus ingerida, se estimó la DMI₅₀ suponiendo que un virus concentrado 10 veces más infectaría al 100% de los mosquitos.

^e nc = no calculado, puesto que no se detectó antígeno de virus.

La quimerización de los genes estructurales de DEN2 con el virus rDEN4Δ30 dio como resultado un virus, rDEN2/4Δ30(CME), que tenía replicación disminuida en células Vero en comparación con cualquier virus original. Para evaluar las mutaciones de adaptación a células Vero (Blaney, J. E. *et al.* 2002 *Virology* 300:125-139) como medio para aumentar el rendimiento de virus de un candidato a vacuna contra DEN en células Vero, se introdujeron mutaciones seleccionadas en este virus quimérico. Por consiguiente, se recuperaron virus rDEN2/4Δ30(CME) que portaban mutaciones de adaptación, terminalmente diluidos, y se propagaron en células C6/36 para determinar si podía aumentarse el rendimiento de virus en células Vero.

10 Se generaron virus rDEN2/4Δ30(CME) que portaban mutaciones de adaptación de células Vero tal como sigue. Se

cortaron fragmentos de ADN a partir de construcciones de ADNc de rDEN4 que abarcaban mutaciones de adaptación a células Vero de DEN4 individuales o dobles y se introdujeron en el clon de ADNc de rDEN2/4Δ30(CME). La presencia de la mutación de adaptación a células Vero se confirmó mediante análisis de secuencia, y se transfectoron transcritos de ARN derivados de los clones de ADNc mutantes, se diluyeron terminalmente y se propagaron en células C6/36.

Para la evaluación de la cinética de crecimiento, se infectaron células Vero con los virus indicados a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Se lavaron monocapas de células confluentes en frascos de cultivo tisular de 25 cm² por duplicado y se recubrieron con un inóculo de 1 ml que contenía el virus indicado. Tras una incubación de dos horas a 37°C, se lavaron las células tres veces en MEM y se añadieron 5 ml de MEM complementado con FBS al 2%. Se retiró una alícuota de 1 ml de medio de cultivo tisular, se reemplazó por medio nuevo, y se designó el punto de tiempo día 0. A los puntos de tiempo indicados tras la infección, se retiraron muestras de 1 ml de medio de cultivo tisular, se clarificaron mediante centrifugación y se congelaron a -80°C. El nivel de replicación del virus se sometió a ensayo mediante titulación de placas en células C6/36 y se visualizó mediante tinción con inmunoperoxidasa. El límite de detección era < 0,7 log₁₀ UFP/ml.

Las propiedades de crecimiento de virus rDEN2/4Δ30(CME) que portaban mutaciones de adaptación a células Vero individuales en NS4B -7153, -7162, -7163, -7182, NS5 -7630 o tres combinaciones de mutaciones se compararon en células Vero con el virus rDEN2/4Δ30 (CME) (figura 10). Sin una mutación de adaptación a células Vero introducida, el rendimiento del virus rDEN2/4Δ30(CME) tenía un pico a 4,4 log₁₀ UFP/ml. Cada mutación de adaptación individual y las mutaciones combinadas conferían un aumento sustancial en la replicación. Específicamente, rDEN2/4Δ30(CME)-7182 creció al título más alto de 7,1 log₁₀ UFP/ml, lo que era un aumento de 500 veces en el rendimiento. rDEN2/4Δ30(CME)-7162 tuvo el rendimiento más bajo pero aún se aumentó 125 veces con respecto al nivel de replicación por el virus rDEN2/4Δ30(CME). La introducción de dos mutaciones de adaptación en el virus rDEN2/4Δ30(CME) no aumentó significativamente el rendimiento de virus con respecto a los virus que portaban mutaciones de adaptación a células Vero individuales. El aumento observado de hasta 500 veces en el rendimiento de virus mediante la introducción de una mutación de adaptación a células Vero en este candidato a vacuna quimérica demuestra el valor de identificar y caracterizar secuencias promotoras de la replicación específicas en virus DEN.

Estos resultados tienen particular importancia para el desarrollo de una vacuna contra el virus del dengue de atenuados vivos. En primer lugar, está claro que la quimerización conduce a la atenuación del virus resultante, tal como se indica por estudios en monos rhesus, ratones HuH7-SCID y mosquitos. Aunque no se llegó a esta conclusión en el estudio previo con los virus quiméricos DEN2/DEN4 o DEN1/DEN4 (Bray, M. *et al.* 1996 J Virol 70:4162-6), el examen cuidadoso de los datos sugeriría que los virus quiméricos están más atenuados en monos en comparación con los virus originales de tipo silvestre. En segundo lugar, la mutación Δ30 puede aumentar adicionalmente esta atenuación de una manera dependiente de virus quiméricos. Específicamente, en este ejemplo, los virus quiméricos que portaban la región CME de DEN2 se sobreatenuaron mediante la adición de Δ30, mientras que el fenotipo de atenuación de virus quiméricos que portaban solo la región ME de DEN2 no se alteró por la adición de la mutación Δ30. Este hallazgo inesperado indica que en una vacuna tetravalente compuesta por virus de componentes individuales que portan una mutación atenuante compartida, tal como la mutación Δ30, solo pueden utilizarse los virus quiméricos de ME puesto que los virus quiméricos de CME que portan la mutación Δ30 pueden sobreatenuarse en monos rhesus y podrían proporcionar solo inmunogenicidad limitada en seres humanos.

EJEMPLO 6

Generación y caracterización de virus DEN3 quiméricos intertipicos que contienen la mutación Δ30

Se han generado virus quiméricos a base del ADNc de DEN4 en los que los genes CME o ME se han reemplazado por los genes correspondientes derivados de DEN3 (Sleman/78), un aislado de virus del brote de dengue de 1978 en la región de Sleman de Indonesia (Gubler, D.J. *et al.* 1981 Am J Trop Med Hyg 30:1094-1099) (apéndice 2). Tal como se describe en el ejemplo 5 para los virus quiméricos DEN2, se generaron virus quiméricos de CME para DEN3 reemplazando la región *BglII* / *XhoI* del ADNc o bien para rDEN4 o bien para rDEN4Δ30 por una región similar derivada de DEN3 (Sleman/78) (figura 11A). Igualmente, para crear los virus quiméricos de ME, se reemplazó la región *PstI* / *XhoI* del ADNc o bien para rDEN4 o bien para rDEN4Δ30 por una región similar derivada de DEN3 (Sleman/78). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las uniones resultantes se muestran en la figura 11B. Se confirmaron los genomas de los virus resultantes mediante análisis de secuencia del ARN viral aislado a partir de virus recuperado tal como des describió previamente (Durbin, A.P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65: 405-13). Se identificaron mutaciones imprevistas que surgían del pase de virus en cultivo tisular en todos los virus y se enumeran en la tabla 34. Particularmente, cada virus contenía una mutación de cambio de sentido en NS4B correspondiente a una mutación previamente identificada a partir de rDEN4 y asociada con la adaptación al crecimiento en células Vero (véase la tabla 30 para la correlación de las posiciones de nucleótido entre rDEN4 y virus quiméricos). Todos los virus se replicaban en células Vero a títulos en exceso de 5,7 log₁₀ UFP/ml, lo que indica que los virus quiméricos, incluso los que contienen la mutación Δ30, se replican eficazmente en cultivo celular, una propiedad esencial para la fabricación de la vacuna.

Tabla 34. Mutaciones de cambio de sentido observadas entre los virus DEN3/4 quiméricos que se han hecho crecer en células Vero

| Virus | Gen | Posición de nucleótido | Cambio de nucleótidos | Posición de aminoácido | Cambio de aminoácidos |
|---------------------------|------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| rDEN3/4 Δ 30 (CME) | M | 825 | T > C | 242 | Phe > Leu |
| | E | 1641 | C > T | 514 | Leu > Phe |
| | E | 2113 | A > G | 671 | Lys > Arg |
| | NS4B | 7159 ^a | T > C | 2353 | Leu > Ser |
| rDEN3/4(ME) | M | 460 | A > G | 120 | Asp > Gly |
| | NS4B | 7177 ^b | G > U | 2359 | Gly > Val |
| | NS5 | 7702 | C > U | 2534 | Ser > Phe |
| rDEN3/4 Δ 30(ME) | E | 1432 | A > U | 444 | Gln > Leu |
| | NS4B | 7156 ^a | U > C | 2352 | Leu > Ser |
| | NS5 | 8692 | A > C | 2864 | Asn > His |

^aMisma posición de nucleótido que 7162 en rDEN4.

^bMisma posición de nucleótido que 7183 en rDEN4.

5 Tal como se describe en los ejemplos anteriores, los ratones SCID con trasplante de células HuH-7 son un modelo sensible para la evaluación de la atenuación del virus del dengue. Se inoculó cada virus DEN3/4 quimérico en grupos de ratones SCID-HuH-7 y se determinaron los niveles de virus en el suero (tabla 35). Mientras que el virus quimérico rDEN3/4 (CME) no se atenuó, los virus quiméricos restantes se replicaron a niveles entre 40 y 400 veces inferiores que cualquiera de los virus originales (rDEN4 y DEN3-Sleman/78). En el virus quimérico de CME, proporcionando la mutación Δ 30 una extraordinaria reducción de 2,7 \log_{10} en la replicación. Este nivel de atenuación conferido por la mutación Δ 30 en el virus quimérico de CME era mucho mayor que el observado previamente para rDEN4 Δ 30. El virus rDEN3/4 (ME) tenía una reducción de la replicación de 100 veces en comparación con cualquier virus original, lo que indica que la quimerización de ME era atenuante *per se*. La adición de la mutación Δ 30 a rDEN3/4 (ME) no dio como resultado una atenuación adicional.

15 **Tabla 35.** La quimerización entre los tipos 3 y 4 de virus del dengue da como resultado virus recombinantes que están atenuados para ratones HuH-7-SCID

| Virus ^a | N.º de ratones | Título de virus pico medio (\log_{10} ufp/ml \pm EE) | Grupo estadístico ^b |
|---------------------------|----------------|---|--------------------------------|
| rDEN4 | 32 | 6,3 \pm 0,2 | A |
| DEN3-Sleman/78 | 23 | 6,4 \pm 0,2 | A |
| rDEN3/4 (CME) | 7 | 6,4 \pm 0,6 | A |
| rDEN3/4 Δ 30 (CME) | 5 | 3,7 \pm 0,4 | B |
| rDEN3/4 (ME) | 6 | 4,2 \pm 0,7 | B |
| rDEN3/4 Δ 30 (ME) | 7 | 4,7 \pm 0,4 | A,B |

^aSe inocularon a grupos de ratones HuH-7-SCID en el tumor con 4,0 \log_{10} UFP del virus indicado. Se recogió suero en el día 7 y se determinó el título de virus en células Vero.

^bLos títulos pico medios se asignaron a grupos estadísticos usando la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey ($P < 0,05$). Los grupos con la misma designación de letra no son significativamente diferentes.

20 Se realizó la evaluación de la replicación e inmunogenicidad de los virus recombinantes quiméricos DEN3 y el virus DEN3 de tipo natural en monos tal como se describe en el ejemplo 5. Los resultados de este estudio de seguridad e inmunogenicidad en monos se presentan en la tabla 36. Los monos a los que se les inoculó rDBN3/4(CME) y DEN de tipo natural (Sleman/78) fueron virémicos durante aproximadamente 2 días con un título pico medio de entre 1,6 y 1,8 \log_{10} UFP/ml, respectivamente, lo que indica que la quimerización de los genes estructurales CME de DEN3 no conducía a la atenuación de la replicación del virus, un patrón diferente del observado para la quimerización de DEN2 (tabla 31). Sin embargo, la quimerización de los genes estructurales de ME dio como resultado virus

atenuados con viremia no detectable en monos, aunque todos los monos experimentaron seroconversión con un aumento de más de 10 veces en los niveles de anticuerpos séricos. Tal como se espera para un virus atenuado, la respuesta inmunitaria, tal como se mide mediante el título de anticuerpos neutralizantes, era inferior tras la inoculación con cualquiera de los virus quiméricos en comparación con la inoculación con DEN3 de tipo natural (Sleman/78), aunque suficientemente alta para proteger a los animales frente a la exposición al virus DEN3 de tipo natural (tabla 37). Está claro que la adición de la mutación $\Delta 30$ a rDEN3/4(CME) podía atenuar adicionalmente el virus resultante rDEN3/4 $\Delta 30$ (CME).

Tabla 36. La mutación $\Delta 30$ atenúa adicionalmente rDEN3/4(CME) para monos Rhesus

| Virus ^a | N.º de monos | N.º medio de días virémicos por mono ^b | Título de virus pico medio (\log_{10} UFP/ml \pm EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|---------------------------|--------------|---|---|---|--------|
| | | | | Día 0 | Día 28 |
| DEN3 (Sleman/78) | 4 | 2,3 | 1,8 | <5 | 707 |
| rDEN3/4 (CME) | 4 | 2,0 | 1,6 | <5 | 211 |
| rDEN3/4 $\Delta 30$ (CME) | 4 | 0 | <1,0 | <5 | 53 |
| rDEN3/4 (ME) | 4 | 0 | <1,0 | <5 | 70 |
| rDEN3/4 $\Delta 30$ (ME) | 4 | 0 | <1,0 | <5 | 58 |

^a Se inocularon a grupos de monos rhesus por vía subcutánea 10^5 UFP del virus indicado en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días 0 a 6, 8, 10, 12 y 28. Se determinó el título de virus mediante ensayo de placas en células Vero.

^b No se detectó viremia en ningún mono tras el día 4.

Tabla 37. Los virus quiméricos rDEN3/4 protegen a monos rhesus frente a la exposición al virus DEN3 de tipo natural

| Virus ^a | N.º de monos | N.º medio de días virémicos por mono tras la exposición a rDEN3 | Título de virus pico medio (\log_{10} UFP/ml \pm EE) | Título de anticuerpos neutralizantes séricos, media geométrica (dilución recíproca) | |
|---------------------------|--------------|---|---|---|--------|
| | | | | Día 28 | Día 56 |
| Simulada | 2 | 5,0 | $2,5 \pm 0,4$ | < 5 | 372 |
| DEN3 (Sleman/78) | 4 | 0 | <1,0 | 707 | 779 |
| rDEN3/4 (CME) | 4 | 0 | <1,0 | 211 | 695 |
| rDEN3/4 $\Delta 30$ (CME) | 4 | 0,8 | $1,1 \pm 0,2$ | 53 | 364 |
| rDEN3/4 (ME) | 4 | 0 | <1,0 | 70 | 678 |
| rDEN3/4 $\Delta 30$ (ME) | 4 | 0 | <1,0 | 58 | 694 |

^a 28 días tras la inoculación primaria con los virus indicados, se expusieron los monos rhesus por vía subcutánea a 10^5 UFP de virus DEN3 (Sleman/78) en una dosis de 1 ml. Se recogió suero en los días 28 a 34, 36, 38 y 56. Se determinó el título de virus mediante ensayo en placa en células Vero.

Para evaluar los niveles de replicación de cada virus quimérico DEN3/4 en mosquitos, se infectaron *Aedes aegypti* mediante ingestión de una harina de sangre que contenía virus (tabla 38). Los virus originales rDEN4 y DEN3 (Sleman/78) infectan fácilmente *Ae. aegypti*. También se sometió a prueba cada uno de los virus quiméricos rDEN3/4. En muchos casos no fue posible infectar *Ae. aegypti* con una reserva de virus sin diluir de título suficiente para lograr una infección detectable debido a la muy baja infectividad de varios de los virus. A una dosis de aproximadamente 2,8 - 2,9 log₁₀ UFP, rDEN4, DEN3 (Sleman/78) y rDEN3/4(CME) eran igualmente infecciosos y se diseminaban hasta la cabeza con igual eficacia. Para los virus quiméricos restantes, la infección no fue detectable incluso a una dosis de 3,4 log₁₀ UFP, lo que indica que la replicación de rDEN3/4(ME) y rDEN3/4Δ30(CME) está restringida en *Ae. aegypti*. Comparando la infectividad de rDEN3/4(CME) y rDEN3/4Δ30(CME), está claro que la mutación Δ30 puede atenuar adicionalmente el virus quimérico para mosquitos.

Tabla 38. Capacidad de virus quiméricos DEN3/4 para infectar *Aedes aegypti* alimentados con una harina de sangre infecciosa.

| Virus sometido a prueba | Dosis ingerida (log ₁₀ ufp) ^a | N.º de mosquitos sometidos a prueba | N.º (%) de infecciones en el intestino medio ^{b, c, d} | N.º (%) de infecciones diseminadas ^e |
|-------------------------|---|-------------------------------------|---|---|
| rDEN4 | 3,8 | 18 | 14 (77%) | 2 (14%) |
| | 2,8 | 20 | 7 (34%) | 2 (10%) |
| | 1,8 | 18 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ = 3,4 | DMI ₅₀ ≥ 4,4 |
| DEN3 (Sleman) | 2,9 | 16 | 3 (18%) | 2 (12%) |
| | 1,9 | 10 | 1 (10%) | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 3,5 | DMI ₅₀ ≥ 3,5 |
| rDEN3/4 (CME) | 3,9 | 20 | 6 (30%) | 2 (10%) |
| | 2,9 | 18 | 4 (22%) | 0 |
| | 1,9 | 13 | 1 (7%) | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 4,2 | DMI ₅₀ ≥ 4,5 |
| DEN3/4Δ30 (CME) | 3,3 | 20 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 4,3 | DMI ₅₀ ≥ 4,3 |
| DEN3/4 (ME) | 3,4 | 15 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 4,4 | DMI ₅₀ ≥ 4,4 |

^a Cantidad de virus ingerida, suponiendo una harina de sangre de 2μ.

^b Número (porcentaje) de mosquitos con virus del dengue detectable en tejido de intestino medio; se sometieron a ensayo los mosquitos 21 días tras la alimentación, y se identificó el antígeno de virus del dengue mediante IFA.

^c Cuando se detectó infección, pero no superaba una frecuencia del 50% a la dosis más alta de virus ingerida, se estimó la DMI₅₀ suponiendo que una dosis de virus concentrada 10 veces más infectaría al 100% de los mosquitos.

^d Cuando no se detectó infección, se supuso que la DMI₅₀ era mayor que una dosis de virus 10 veces superior que la usada.

^e Número (porcentaje) de mosquitos con antígeno de virus del dengue detectable tanto en tejido de intestino medio como de cabeza.

15

EJEMPLO 7

Generación y caracterización de virus DEN1 quiméricos intertípicos que contienen la mutación Δ30

Se han generado virus quiméricos a base del ADNc de DEN4 en los que los genes CME o ME se han reemplazado por los genes correspondientes derivados de DEN1 (Puerto Rico/94), un aislado de virus a partir de un brote de dengue de 1994 en Puerto Rico (apéndices 3 y 4). Tal como se describe en el ejemplo 4 para los virus quiméricos DEN2, se generaron virus quiméricos de CME para DEN1 reemplazando la región *BglII* / *XhoI* del ADNc o bien para rDEN4 o bien para rDEN4Δ30 por una región similar derivada de DEN1 (Puerto Rico/94) (figura 12A). Igualmente, para crear los virus quiméricos de ME, se reemplazó la región *PstI* / *XhoI* del ADNc o bien para rDEN4 o bien para

25

rDEN4Δ30 por una región similar derivada de DEN1 (Puerto Rico/94). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las uniones resultantes se muestran en la figura 12B.

5 Para la transcripción y generación de virus, se linealizaron clones de ADNc quiméricos y se usaron como molde en una reacción de transcripción usando ARN polimerasa SP6 tal como se describe. Se introdujeron transcritos en células de mosquito C6/36 usando transfección mediada por liposomas y se recogió virus del dengue recombinante entre el día 7 y 14. Posteriormente se hicieron crecer virus en células Vero y se clonaron biológicamente mediante dilución terminal en células Vero. Todos los virus se replicaban en células Vero a títulos en exceso de 6,0 log₁₀ UFP/ml, lo que indica que los virus quiméricos, incluso los que contenían la mutación Δ30, se replican eficazmente en cultivo celular. Actualmente se ha iniciado el análisis de la secuencia genómica para identificar mutaciones imprevistas que surgen del pase del virus en cultivo tisular.

15 Para evaluar los niveles de replicación de los virus quiméricos DEN1/4(CME) y rDEN1/4Δ30(CME) en mosquitos, se infectaron *Aedes aegypti* mediante la ingestión de una harina de sangre que contenía virus (tabla 39). El virus original rDEN4 infecta *Ae. aegypti* con una DMI₅₀ de 4,0 log₁₀ UFP. Sin embargo, el virus original DEN1 (Puerto Rico/94), no puede infectar *Ae. aegypti* a una dosis de hasta 3,4 log₁₀ UFP. Por tanto, los virus quiméricos de CME DEN1/4 y rDEN1/4Δ30 comparten esta incapacidad para infectar *Ae. aegypti*. Por tanto, en *Ae. aegypti* es innecesario evaluar el efecto de la mutación Δ30 sobre la infectividad de los virus quiméricos DEN1/4, de una manera similar a la usada para los virus quiméricos DEN2/4 y DEN3/4.

20

Tabla 39. Incapacidad de virus quiméricos DEN1/4 para infectar *Aedes aegypti* alimentados con una harina de sangre infecciosa.

| Virus sometido a prueba | Dosis ingerida (log ₁₀ ufp) ^a | N.º de mosquitos sometidos a prueba | N.º (%) de infecciones en el intestino medio ^{b,c,d} | N.º (%) de infecciones diseminadas |
|-------------------------|---|-------------------------------------|---|------------------------------------|
| rDEN4 | 4,3 | 21 | 18 (85%) | 8 (44%) |
| | 3,3 | 15 | 3 (20%) | 0 |
| | 2,3 | 20 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ = 4,0 | DMI ₅₀ ≥ 4,3 |
| DEN1 (Puerto Rico/ 94) | 3,4 | 21 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 4,4 | DMI ₅₀ ≥ 4,4 |
| rDEN 1/4 (CME) | 3,8 | 20 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 4,8 | DMI ₅₀ ≥ 4,8 |
| rDEN1/4Δ30 (CME) | 2,8 | 20 | 0 | 0 |
| | | | DMI ₅₀ ≥ 3,8 | DMI ₅₀ ≥ 3,8 |

^a Cantidad de virus ingerida, suponiendo una harina de sangre de 2 µl.

^b Número (porcentaje) de mosquitos con virus del dengue detectable en tejido de intestino medio; se sometieron a ensayo los mosquitos 21 días tras la alimentación, y se identificó el antígeno de virus del dengue mediante IFA.

^c Cuando se detectó infección, pero no superaba una frecuencia del 50% a la dosis más alta de virus ingerida, se estimó la DMI₅₀ suponiendo que una dosis de virus concentrada 10 veces más infectaría al 100% de los mosquitos.

^d Cuando no se detectó infección, se supuso que la DMI₅₀ era mayor que una dosis de virus 10 veces superior que la usada.

^e Número (porcentaje) de mosquitos con antígeno de virus del dengue detectable tanto en tejido de intestino medio como de cabeza.

25 Tal como se describe en los ejemplos anteriores, los ratones SCID con trasplante de células HuH-7 son un modelo sensible para la evaluación de la atenuación del virus del dengue. Se inoculó cada virus DEN1/4 quimérico en grupos de ratones SCID-HuH-7 y se determinaron los niveles de virus en el suero (tabla 40). Los virus quiméricos se replicaron a niveles entre 15 y 250 veces inferiores que cualquiera de los virus originales, rDEN4 y DEN1 (Puerto Rico/94). Los virus quiméricos de CME estaban más atenuados que los virus quiméricos de ME comparables, proporcionando la mutación Δ30 una reducción en la replicación de 0,8 log₁₀. Este nivel de atenuación ejercido por la mutación Δ30 en los virus quiméricos de CME fue similar al observado previamente para rDEN4Δ30. Sin embargo, el efecto atenuante de la mutación Δ30 en los virus quiméricos de ME es imperceptible.

30

Tabla 40. La quimerización entre los tipos 1 y 4 de virus del dengue da como resultado virus recombinantes que

están atenuados para ratones HuH-7-SCID

| Virus^a | N.º de ratones | Título de virus pico medio (\log_{10} ufp/ml \pmEE) | Grupo estadístico^b |
|---------------------------|-----------------------|--|--------------------------------------|
| rDEN4 | 32 | 6,3 \pm 0,2 | A |
| DEN1 (Puerto Rico/94) | 4 | 6,4 \pm 0,2 | A |
| rDEN1/4 (CME) | 8 | 4,7 \pm 0,2 | B,C |
| rDEN1/4 Δ 30 (CME) | 6 | 3,9 \pm 0,4 | C |
| rDEN1/4 (ME) | 6 | 5,0 \pm 0,2 | B |
| rDEN1/4 Δ 30 (ME) | 6 | 5,1 \pm 0,3 | B |

^aSe inocularon a grupos de ratones HuH-7-SCID en el tumor 4,0 \log_{10} UFP del virus indicado. Se recogió suero en el día 7 y se determinó el título de virus en células Vero.

^bLos títulos pico medios se asignaron a grupos estadísticos usando la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey ($P < 0,05$). Los grupos con la misma designación de letra no son significativamente diferentes.

APÉNDICE 1

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido p2 de ADNc de DEN2 (Tonga/74)

Bases 1 a 10713: ADNc del genoma del virus DEN2

Bases 97 a 10269: ORF de la poliproteína de DEN2

Bases 97 a 438: ORF de la proteína C

Bases 439 a 936: ORF de la proteína prM

Bases 937 a 2421: ORF de la proteína E

Bases 2422 a 3477: ORF de la proteína NS1

Bases 3478 a 4131: ORF de la proteína NS2A

Bases 4132 a 4521: ORF de la proteína NS2B

Bases 4522 a 6375: ORF de la proteína NS3

Bases 6376 a 6756: ORF de la proteína NS4A

Bases 6757 a 6825: ORF de la proteína 2K

Bases 6826 a 7569: ORF de la proteína NS4B

Bases 7570 a 10269: ORF de la proteína NS5

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGGACAAAGACAGATTCTTTTGAGGGAGCTAAGCTCAACGTTAGTTCTTAACTGTTTTTTTGGATTAGAGAGCAGATCTCTGTGATGA
Met>

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
ATAACCAACGGAAAAAGCGGAGAAACACCGCCTTTTCAATATGCTGAAACGGGAGAGAAACCCGGTGTCACTGTACAAACAGTTGACAAAGAGATTCTCCT
AsnAsnGlnArgLysLysAlaArgAsnThrProPheAsnMetLeuLysArgGluArgAsnArgValSerThrValGlnGlnLeuThrLysArgPheSerLeu>

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGGAAATGCTGCAGGGACGAGACCACTAAATAATGTTTCATGGCCCTGGTGGCATTCTTCGTTTCCTTAAACAATCCCACCAACAGCAGGGATATTTAAAAAGA
GlyMetLeuGlnGlyArgGlyProLeuLysLeuPheMetAlaLeuValAlaPheLeuArgPheLeuThrIleProProThrAlaGlyIleLeuLysArg>

```

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TGGGGAACAATTAATAAAGGCTATTAATGTTCTGAGAGGCTTCAGGAAGAGATTGGAAGGATGCTGAATATCTTAAACAGGAGACGTAGAACTG
 TrpGlyThrIleLysLysSerLysAlaIleAsnValLeuArgGlyPheArgLysGluIleGlyArgMetLeuAsnIleLeuAsnArgArgArgThr>

 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TAGGCATGATCATCTGACTCCACAGTGTGGGGTTTCATCTGACCACCGCAACGAGAACACACATGATGTCAGTAGACAAGAAAAGGAA
 ValGlyMetIleIleMetLeuThrProThrValMetAlaPheHisLeuThrThrArgAsnGlyGluProHisMetIleValSerArgGlnGluLysGlyLys>

 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AAGCCTTCTGTCAAGACAAGGATGGCACGAACATGTGTACCCCTCATGGCCATGGACCTGGTGTGTTGTGAAGACACAAATCACCGTATAAATGTCCT
 SerLeuLeuPheLysThrLysAspGlyThrAsnMetCysThrLeuMetAlaMetAspLeuGluLeuCysGluAspThrIleThrTyrLysCysPro>

 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TTTCTCAAGCAGAACGAAACAGACATAGATTGTTGGTCAACTCCCGTCCACATGGGTAACCTTATGGGACATGTACCACACAGGAGACAGAA
 PheLeuLysGlnAsnGluProGluAspIleAspCysTyrCysAsnSerThrSerThrTrpValThrTyrGlyThrCysThrThrThrGlyGluHisArg>

 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GAGAAAAGATCAGTGGGCTTGTCCACACGTTGGAAATGGATGGAGACACGAACAGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTGGAACATGCCCCA
 ArgGluLysArgSerValAlaLeuValProHisValGlyMetGlyLeuGluThrArgThrGluThrTrpMetSerSerGluGlyAlaTrpLysHisAlaGln>

 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GAGAAITGAAACTTGGATTCTGAGACATCCAGGCTTTACCAATAATGGCCGAATCCCTGSCATACACCATAGGGACGACGCTTTCCAAAGAGTCTGATA
 ArgIleGluThrTrpIleLeuArgHisProGlyPheThrIleMetAlaAlaIleLeuAlaTyrThrIleGlyThrThrHisPheGlnArgValIleuIle>

 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 TTCATCCTACTGACAGCCATCGCTCCTCAATGACAATGCGCTGCATAGGAATATCAATAGGGACTTTGTGGAAAGGAGTGTACAGAGGGGAGTTGGGTTG
 PheIleLeuLeuThrAlaIleAlaProSerMetThrMetArgCysIleGlyIleSerAsnArgAspPheValGluGlyValSerGlyGlySerTrpVal>

 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 ACATAGTTTTAGAACATGGAAGTTGTGTCAGGAGATGGCAAAAACAACCAACACTGGACTTTGAACTGTATAAAACAGAAAGCCAAACACTGCCAC
 AspIleValLeuGluHisGlySerCysValThrThrMetAlaLysAsnLysProThrLeuAspPheGluLeuIleLysThrGluAlaLysGlnProAlaThr>

 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CTTAAGGAGTACTGTATAGAGGCCAAACTGACCAACCGAACAGACTCGCGTGGCCCAACAAAGGGGAACCCACCCTGATGAATGAAGAGCAGACAAA
 LeuArgLysTyrCysIleGluAlaLysLeuThrAsnThrThrThrAspSerArgCysProThrGlnGlyGluProThrLeuAsnGluGluGlnAspLys>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 AGTTTGTGTCAAACATTCATGGTAGACAGAGGATGGGAAATGGATGTGGATTGTTGGAAAAGGAGGCATCGTGACCTGTGTATGTTCCACATGCA
 ArgPheValCysLysHisSerMetValAspArgGlyTrpGlyAsnGlyCysGlyLeuPheGlyLysGlyGlyIleValThrCysAlaMetPheThrCys>

 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 AAAAGAACATGGAAGGAAAAATTTGTCAGCCAGAAAACCTGGAATACACTGTCTGTGATAACACCTCATTCAGGGGAAGAACATGCAGTGGGAAATGACAC
 LysLysAsnMetGluGlyLysIleValGlnProGluAsnLeuGluTyThrValIleThrProHisSerGlyGluGluHisAlaValGlyAsnAspThr>

 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AGGAAAACATGGTAAAGAAGTCAAGATAACACCACAGAGTCCATCACAGAGCGGAACTGACAGGCTATGGCACTGTACGATGGAGTGTCTCCARGA
 GlyLysHisGlyLysGluValLysIleThrProGlnSerSerIleThrGluAlaGluLeuThrGlyTyThrValThrMetGluCysSerProArg>

 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 ACGGGCTCGACTTCAATGAGATGGTGTGCTGCAAAATGGAAGACAAAGCCCTGGTGCACAGACAATGGTTCCTTAGACCTACCGTGGCCATGGCTGC
 ThrGlyLeuAspPheAsnGluMetValLeuLeuGlnMetGluAspLysAlaTrpLeuValHisArgGlnTrpPheLeuAspLeuProLeuProTrpLeu>

 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CCGGAGCAGACACACAAGGATCAAATTTGGATACAGAAAAGAAACACTGGTCACCTTCAAAAATCCCCATCGGAAAAAACAGGATGTTGTCTTAGGATC
 ProGlyAlaAspThrGlnGlySerAsnTrpIleGlnLysGluThrLeuValThrPheLysAsnProHisAlaLysLysGlnAspValValValLeuGlySer>

 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CCAAGAGGGGCCCATGCATACAGCACTCACAGGGCTACGGAAATCCAGATGTATCAGGAAACCTGTCTTTCACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGA
 GlnGluGlyAlaMetHisThrAlaLeuThrGlyAlaThrGluIleGlnMetSerSerGlyAsnLeuLeuPheThrGlyHisLeuLysCysArgLeuArg>

 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 ATGGACAATTACAACCTTAAAGGGATGTCACTACTCCATGTGCACAGGAAAGTTTAAAAATTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAAACAATAGTCA
 MetAspLysLeuGlnLeuLysGlyMetSerTySerMetCysThrGlyLysPheLysIleValLysGluIleAlaGluThrGlnHisGlyThrIleVal>

 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 TTAGAGTACAATATGAAGGAGACGGCTCTCCATGCAAGATCCCCTTTGAGATAATGGATCTGGAAAAAAGACATGTTTGGCCGCTGATCACAGTCAA
 IleArgValGlnTyGluGlyAspGlySerProCysLysIleProPheGluIleMetAspLeuGluLysArgHisValLeuGlyArgLeuIleThrValAsn>

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CCCAATTGTAACAGAAAGGACAGTCCAGTCCAGTCAACATAGAGAGAACTCCATTGGAGACAGCTACATCATCATAGAGTGGACCCAGGACAAATTGAAG
 ProfileValThrGluLysAspSerProValAsnIleGluAlaGluProPheGlyAspSerTyrIleIleIleGlyValGluProGlyGlnLeuLys>

 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 CTGGACTGGTTCAAGAAAGGAAAGTCCCATCGGCCAAATGTTTGAGACAACAATGAGGGAGCGMAAAGAATGGCCATTTTGGTGACACACAGCCCTGGGATT
 LeuAspTrpPheLysLysGlySerIleGlyGlnMetPheGluThrMetArgGlyAlaLysArgMetAlaIleLeuGlyAspThrAlaTrpAsp>

 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 TTGGATCTCTGGGAGGAGTGTTCACATCAATAGAAAGGCTCCACCAGGTTTTGGAGCAATCTACGGGGCTGCTTTCAGTGGGCTCATGGACTAT
 PheGlySerLeuGlyGlyValPheThrSerIleGlyLysAlaLeuHisGlnValPheGlyAlaIleTyrGlyAlaAlaPheSerGlyValSerTrpThrMet>

 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GAAGATCCTCATAGGAGTTATCATCATGGATAGGAATGAATCACTCAGTAGCAGTACTGCTGAGCGTGCACCTGGTTPAGTGGAACTCGTGACACTTTAC
 LysIleLeuIleGlyValIleIleThrTrpIleGlyMetAsnSerArgSerThrSerLeuSerValSerLeuValLeuValGlyIleValThrLeuTyr>

 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 TTGGGAGTTATGGTGCAGGCCGAVAGTGGTGGCTGTGAGCTGGAAGAACAAGAACTGAGGAGTAAATGTCAGTGGAAATATTCGTACACAGATAACGGTGCATA
 LeuGlyValMetValGlnAlaAspSerGlyCysValValSerTrpLysAsnLysGluLeuLysCysGlySerGlyIlePheValThrAspAsnValHis>

 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 CATGGACAGAAACAATACAAGTTCCAAACCAGAAATCCCTTCAAAACTGGCCTCAGCCATCCAGAAAGCGCATGAAGAGGCATCTGTGGAATCCGCTCAGT
 ThrTrpThrGluGlnTyrLysPheGlnProGluSerProSerLysLeuAlaSerAlaIleGlnLysAlaHisGluGluGlyIleCysGlyIleArgSerVal>

 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 AACAAAGACTGGAAAAATCTTATGTGGAAACAGATAACATCAGAAATGAATCATATTTCTATCAGAAATAAGTGAACCTGACCATCATGACAGGAGACATC
 ThrArgLeuGluAsnLeuMetTrpLysGlnIleThrSerGluLeuAsnHisIleLeuSerGluAsnGluValLysLeuThrIleMetThrGlyAspIle>

 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 AAAGGAATCATGCAGGTAGGAAAACGATCTTTGGCGCCTCAACCACCTGAGTTGAGGTATTCATGGAAACATGGGTAAGCGAAATGCTCTCCACAG
 LysGlyIleMetGlnValGlyLysArgSerLeuArgProGlnProThrGluLeuArgTyrSerTrpLysThrTrpGlyLysAlaLysMetLeuSerThr>

 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 AACTCCACAATCAGACCTTCCATTGATGGTCCCGAAACAGCAGAAATGCCCAACACAAACAGAGCTTGGAAATTCACCTGGAAGTTGAGGACTACCGGCTT
 GluLeuHisAsnGlnThrPheLeuIleAspGlyProGluThrAlaGluCysProAsnThrAsnArgAlaTrpAsnSerLeuGluValGluAspTyrGlyPhe>

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 TGGAGTATTCACCTACCAATATATGGCTAAGATTGAGAGAAAAGCAGGATGTATTTTGTGACTCAAAAACCTCATGTGAGCGGCCATAAAAGGACAAACAGAGCC
 GlyValPheThrThrAsnIleTyrLeuArgLeuArgGluLysGlnAspValPheCysAspSerLysLeuMetSerAlaAlaIleLysAspAsnArgAla>

 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 GTCCATGTGATATGGTTATTGGATAGAAAAGCGCACTCAATGATACATGGAAGATAGAGAAAAGCTTCTTTCATTTGAAGTCAAAAAGTTGCCACITGGCCAA
 ValHisAlaAspMetGlyTyrTyrIleGluSerAlaLeuAsnAspThrTyrLysIleGluLysAlaSerPheIleGluValLysSerCysHisTyrPro>

 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 AGTCACACACCCCTATGGAGTAATGGAGTGTAGAAAAGCGAGATGGTCAATCCAAAGAATTTTCGTGGACCAGTGTCAACAACATAATAACAGACCAGGCTA
 LysSerHisThrLeuTyrSerAsnGlyValLeuGluSerGluMetValIleProLysAsnPheAlaGlyProValSerGlnHisAsnAsnArgProGlyTyr>

 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 TTACACACAACAGCAGGACCTTGGCATCTAGGCAAGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTCGAAGGACTACAGTGGTGTAAACCGAGAACCTGTGGAAAC
 TyrThrGlnThrAlaGlyProTyrHisLeuGlyLysLeuGluMetAspPheAspPheCysGluGlyThrThrValValValThrGluAsnCysGlyAsn>

 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 AGAGGGCCCTTTAAGAAACAACCCACTGCCCTCAGGAAAACCTCAATAACGGAATGGTGTTCGATCTTGCACACTACCACCCTAAGATACAGAGGTGAGG
 ArgGlyProSerLeuArgThrThrThrAlaSerGlyLysLeuIleThrGluTyrCysArgSerCysThrLeuProProLeuArgTyrArgGlyGlu>

 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 ATGGATGTGGTACGGGATGGAAATCAGACCATTGAAAGAGAAAAGAAAANTCTGGTCAGTTCTCTGTGTACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAAATTT
 AspGlyCysTyrTyrglyMetGluIleArgProLeuLysGluLysGluAsnLeuValSerSerLeuValThrAlaGlyHisGlyGlnIleAspAsnPhe>

 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 CTCATTTAGGAATCTGGGAATGGCACTGTTCCCTTGAAGAAATGCTCAGGACTCGAGTAGGAAACAAAACATGCAATATTACTCGTCGAGTTTCTTTTCGTG
 SerLeuGlyIleLeuGlyMetAlaLeuPheLeuGluGluMetLeuArgThrArgValGlyThrLysHisAlaIleLeuLeuValAlaValSerPheVal>

 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
 ACGCTAATCAGAGGAAACATGTCTTTTAGAGACCTGGGAAGAGTGTGGTTATGGTGGTGGCCACCATGACAGATGACATAGGCATGGGTGTGACTTATC
 ThrLeuIleThrGlyAsnMetSerPheArgAspLeuGlyArgValMetValMetValGlyAlaThrMetThrAspAspIleGlyMetGlyValThrTyr>

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
 TGGCTCTACTAGCAGCTTTTAGAGTCCAGACCAACCTTTGCAGCTGGACTGCTCTTTGAGAAAACCTGACTCCCAAGGAATTAATGATGACTACCATTAGGAAT
 LeuAlaLeuLeuAlaAlaPheArgValArgProThrPheAlaAlaGlyLeuLeuLeuArgLysLeuThrSerLysGluLeuMetMetThrThrIleGlyIle>
 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 CGTTCCTCTCCAGAGTAGCATACCAGAGACCATTCTTGAACAGCCGCGGTAGTCTAGGCATGATGGTCTCAAGATGGTGAGAAAACATGGAA
 ValLeuLeuSerGlnSerIleProGluThrIleLeuGluLeuThrAspAlaLeuAlaLeuGlyMetMetValLeuLysMetValArgAsnMetGlu>
 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
 AAATATCAGCTGGCAGTACCATCATGGCTATTTGTGCGTCCCAAAATGCTGTGATATTACAGAACGGCATGGAAAGTGAGTTGCACAATATTGGCAGTGG
 LysTyrGlnLeuAlaValThrIleMetAlaIleLeuMetAlaIleLeuGlnAsnAlaTrpLysValSerCysThrIleLeuAlaVal>
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
 TGTCTGTTTCCCTTACATCCTCACAAACAGAAAGCGGACTGGATACCATTAGCGTTGACGATCAAGGCTCTTAATCCCAACAGCCATTTTCT
 ValSerValSerProLeuLeuLeuThrSerSerGlnGlnLysAlaAspTrpIleProLeuAlaLeuThrIleLysGlyLeuAsnProThrAlaIlePheLeu>
 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 AACAAACCTCTCAAGAACCAACAAGAAAGGAGCTGGCCTTTAAATGAGCCCATCATGGCGGTGGATGGTGGATCTTGGCCAGCTCTCTCTTAAAG
 ThrThrLeuSerArgThrAsnLysLysArgSerTrpProLeuAsnGluAlaIleMetAlaValGlyMetValSerIleLeuAlaSerSerLeuLeuLys>
 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
 AATGACATCCCATGACAGGACCATTTAGTGGCTGGAGGCTCCTTACTGTGTGCTACGTGCTAATCGGCGGTGACCGGATCTGGAATTAGAGAGAGCTA
 AsnAspIleProMetThrGlyProLeuValAlaGlyGlyLeuLeuThrValCysTyrValLeuThrGlyArgSerAlaAspLeuGluLeuGluArgAla>
 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
 CCGATGTCAAATGGGATGACCAGGCAGAGATATCAGGTAGCAGTCCATCCTGTCAATAACAATATCAGAAGATGGCAGCATGTCAATAAAGAATGAAGA
 ThrAspValLysTrpAspAspGlnAlaGluIleSerGlySerSerProIleLeuSerIleThrIleSerGluAspGlySerMetSerIleLysAsnGluGlu>
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 GGAAGAGCAACACATGACTATATCTATTAGAACAGGANTGCTTGTGATCTCAGGACTCTTCCGGTATCAATACCATACAGCAGCATGGTATCTG
 GluGluGlnThrLeuThrIleLeuIleArgThrGlyLeuLeuValIleSerGlyLeuPheProValSerIleProIleThrAlaAlaAlaTrpTyrLeu>
 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
 TGGGAAGTAAACAACAACGGGCTGGAGTGTGGGATGTCCCTCCACCACCCCGTGGGAAAAGTGAATGGAAAGATGGAGCCTACAGAATCAAGC
 TrpGluValLysLysGlnArgAlaGlyValLeuTrpAspValProSerProProProValGlyLysAlaGluLeuGluAspGlyAlaTyrArgIleLys>

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
 AAAAAAGGAAATCCTTGGATATTCCAGATCGGAGCTGGAGTTTACAAGAAGGAACATTTACACAACAATGTGGCACCAATGTGGCACCGTCCACACGTTGGCGCTGTCCTAATGCA
 GlnLysGlyIleLeuGlyTyrSerGlnIleGlyAlaGlyValTyrLysGluGlyThrPheHisThrMetTyrHisValThrArgGlyAlaValLeuMetHis>

 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 TRAGGGAGAGAGATTGAACCATCATGCGCGGACGTCAAGAAAGACTTAATATCATATGGAGGAGGTTGGAAGCTAGAAGGAGAAATGGAAGAAGAGAGAA
 LysGlyLysArgIleGluProSerTrpAlaAspValLysLysAspLeuIleSerTyrGlyGlyTyrLysLeuGluGlyGluTrpLysGluGlyGlu>

 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 GAAGTCCAGGTCTTGGCAITGGAGCCAGGGAATAATCCAGAGCCGTCCTCAACAAAAGCCTGGCCCTTTTAGAACCAACTGGAACCATAGGTGCCGTAT
 GluValGlnValLeuAlaLeuGluProGlyLysAsnProArgAlaValGlnThrLysProGlyLeuPheArgThrAsnThrGlyThrIleGlyAlaVal>

 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
 CTCTGGACTTTCCCTGGGACGTCAGGATCTCCAATCGTCGACAAAAAAGGAAAAGTTGTAGGTCTCTATGGCAATGGTGTCTGTACAGGAGTGGAGC
 SerLeuAspPheSerProGlyThrSerGlySerProIleValAspLysLysGlyLysValValGlyLeuTyrGlyAsnGlyValValThrArgSerGlyAla>

 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 ATATGTAGTGCCATAGCTCAGACTGAAAAAAGCAATTCAGACAATCCAGAGATTGAAGATGACATCTTTCCGAAGAGAGAAGATTGACTATCATGGATCTC
 TyrValSerAlaIleAlaGlnThrGluLysSerIleGluAspAsnProGluIleGluAspAspIlePheArgLysArgArgLeuThrIleMetAspLeu>

 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200
 CACCAGGAGCAGGAAAGACAAAGAGATACCTCCCGCCATAGTCAGAGAGGCCATAAAAAAGAGGCTTGAGAACACTAATCCTAGCCCCCCTAGAGTCCG
 HisProGlyAlaGlyLysThrLysArgTyrLeuProAlaIleValArgGluAlaIleLysArgGlyLeuArgThrLeuIleLeuAlaProThrArgVal>

 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300
 TGGCAGCTGAAATGGAGGAGCCCTTAGAGGACTTCCCAATAAGATACCAAACTCCAGCTATCAGGGCTGAGCACACCGGGGAGATTGTAGACTTAAT
 ValAlaAlaGluMetGluGluAlaLeuArgGlyLeuProIleArgTyrGlnThrProAlaIleArgAlaGluHisThrGlyArgGluIleValAspLeuMet>

 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 GTGTCATGCCACATTTACATGAGGCTGCTATCACCATCAGGGTGCCAAATTAACAACCTGATCATCATGGAGCAAGCCCATTTTACAGATCCAGCAAGC
 CysHisAlaThrPheThrMetArgLeuLeuSerProIleArgValProAsnTyrAsnLeuIleIleMetAspGluAlaHisPheThrAspProAlaSer>

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500
 ATAGCAGCTAGGGGATACATCTCAACTCGAGTGGAGATGGGGAGGCAGCTGGAAATTTTATGACAGCCACTCTCCGGGTAGTAGAGATCCATTTCCTC
 IleAlaAlaArgGlyTyrIleSerThrArgValGluMetGlyGluAlaAlaGlyIlePheMetThrAlaThrProProGlySerArgAspProPhePro>

 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600
 AGAGCAATGCACCAATATGGACGAAGAAGAGAAATCCGGAACTCTGGCAGCAGTGGTCCACGGATTTTAAAGGAAAGACTGTCTG
 GlnSerAsnAlaProIleMetAspGluGluArgGluIleProGluArgSerTrpAsnSerGlyHisGluTrpValThrAspPheLysGlyLysThrValTrp>

 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 GTTTGTCCAAAGCATAAAACCCGGAAATGACATGACAGCTGCCCTGAGAAAGAAAGAGGTGATACAACTCAGTAGGAAGACCTTTGATTTCTGAA
 PheValProSerIleLysThrGlyAsnAspIleAlaAlaCysLeuArgLysAsnGlyLysArgValIleGlnLeuSerArgLysThrPheAspSerGlu>

 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800
 TATGTCAAAGACTAGAACCAATGACTGGGATTTCCGTGTTACAACACTGACATCTCGAAATGGGCCCAACTTTAAAGCTGAGAGGGTCAATAGACCCACAGAC
 TyrValLysThrArgThrAsnAspTrpAspPheValValThrThrAspIleSerGluMetGlyAlaAsnPheLysAlaGluArgValIleAspProArg>

 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900
 GCTGCATGAACCCAGTTATATTGCAGACGGCGAGAGCGGGTGTCTGGCAGACCCATGCCAGTGCACCCTAGTGCAGCACAAAGAGGGAG
 ArgCysMetLysProValIleLeuThrAspGlyGluGluArgValIleLeuAlaGlyProMetProValThrHisSerSerAlaAlaGlnArgArgGlyArg>

 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
 AATAGGAAGGAATCCAAAGGAATGAAAATGATCAATATATATATATGGGGAAACCACTGGAAAATGATGAAGACTGTCCGCACCTGGAAGGAAAGCTAAGATG
 IleGlyArgAsnProArgAsnGluAsnAspGlnTyrIleTyrMetGlyGluProLeuGluAsnAspGluAspCysAlaHisTrpLysGluAlaLysMet>

 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100
 CTCCTAGATAATCAACACACACCCTGAAGGAATCAATCCCAGCTTGTTCGAGCCAGAGCGTGAAGAAGGTGGATGCCATTGACGGTGAATATCGCTTGAGAG
 LeuLeuAspAsnIleAsnThrProGluGlyIleIleProSerLeuPheGluProGluArgGluLysValAspAlaIleAspGlyGluTyrArgLeuArg>

 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200
 GAGAAACACGGGAAAACCTTTGTGGACCTAATGAGAAGAGGAGACCTACCAGTCTGTGGCTTATAAAGTGGCAGCTGAAGGTATCAACTACCGCAGACAG
 GlyGluAlaArgLysThrPheValAspLeuMetArgArgGlyAspLeuProValTrpLeuAlaTyrLysValAlaAlaGluGlyIleAsnTyrAlaAspArg>

 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300
 AAGATGGTGTTTTACCGGAACCAATCAAAATCTGGAAATGTGGAAATCTGGACAAAGGAAAGGAAAAAATTTGAAACCT
 ArgTrpCysPheAspGlyThrArgAsnAsnGlnIleLeuGluGluAsnValGluValGluIleTrpThrLysGluGlyLysLysLeuLysPro>

6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400
 AGATGGTTAGATGCTAGGATCTACTCCGACCCACCTGGCGCTAAAAGAGTTCAAGGAATTTGCAGCCGGAAAGAAAGTCCCTAACCCCTGAACCTTAATTACAG
 ArgTrpLeuAspAlaArgIleTyrSerAspProLeuAlaLeuLysGluPheLysGluPheAlaAlaGlyArgLysSerLeuThrLeuAsnLeuIleThr>

 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500
 AGATGGGCAGACTCCCACTTTTATGACTCAGAAGGCCAGAGATGCACACTAGACAACCTTGGCGGTGCTGCACACGGCTGAAGCGGGTGAAGGCATACAA
 GluMetGlyArgLeuProThrPheMetThrGlnLysAlaArgAspAlaLeuAspAsnLeuAlaValLeuHisThrAlaGluAlaGlyGlyLysAlaTyrAsn>

 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
 TCATGCTCTCAGTGAATTTACCGGAGACCCCTGGAGACATTGCTTTTGTGACACTGTTGGCCACAGTCACGGGAGGAATCTTCCTATTCTGTATGAGCGGA
 HisAlaLeuSerGluLeuProGluThrLeuGluThrLeuLeuLeuThrLeuAlaThrValThrGlyGlyIlePheLeuPheLeuMetSerGly>

 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700
 AGGGTATGGGAAGATGACCCCTGGGAATGTGCTGCATAATCAGGGCCAGCATCTCTTATGGTATGCACAAATACAGCCACATTTGGATAGCAGCCTCNA
 ArgGlyMetGlyLysMetThrLeuGlyMetCysIleIleThrAlaSerIleLeuLeuTrpTyrAlaGlnIleGlnProHisTrpIleAlaAlaSer>

 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800
 TAATATTGGAGTTCTTCTCATAGTCTTGCTCATCCAGAACCCAGAAAAGCAGAGGACACCTCAGGATAATCAATTGACTTATGTATCATATAGCCATCCT
 IleIleLeuGluPhePheLeuIleValLeuLeuIleProGluProGluLysGlnArgThrProGlnAspAsnGlnLeuThrTyrValIleIleAlaIleLeu>

 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900
 CACAGTGGTGGCCGCAACCATGGCAAAACGAAATGGGTTTTCTGGAAAAACAAGAAAGACCTCGGACTGGGAAACATTTGCAACTCAGCAACCTGAGAGC
 ThrValValAlaAlaThrMetAlaAsnGluMetGlyPheLeuGluLysThrLysLysAspLeuGlyLeuGlyAsnIleAlaThrGlnGlnProGluSer>

 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000
 AACATTCTGGACATAGATCTACGTCATCAGCATGGACGTTGTATGCCGTGGCTACAACATTTATCACACCAATTTGAGACATAGCATTGAAAAATT
 AsnIleLeuAspIleAspLeuArgProAlaSerAlaTrpThrLeuTyrAlaValAlaThrThrPheIleThrProMetLeuArgHisSerIleGluAsn>

 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100
 CCTCAGTAAATGTGTCCCTAACAGCCATAGCTAACCAAGCCACAGTCTAATGGTCTCGGAAAGGATGGCCATTGTCAAAGATGGACATTTGGAGTTCC
 SerSerValAsnValSerLeuThrAlaIleAlaAsnGlnAlaThrValLeuMetGlyLeuGlyLysGlyTrpProLeuSerLysMetAspIleGlyValPro>

7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
 CCTCCTTGCTATTGGGTGTTACTCACAAGTCAACCCCTATAACCCCTCACAGCGGCTCTCTTTTATTGGTAGCACATTATGCCATCTAGGACCGGACTT
 LeuLeuAlaIleGlyCysTyrSerGlnValAsnProIleThrLeuThrAlaAlaLeuLeuLeuValAlaAlaHisTyrAlaIleIleGlyProGlyLeu>

 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300
 CAAGCCAAAGCAACTAGAGAAAGCTCAGAAAAGAGCAGCAGCGGGCCATCATGAAAACCCCAACTGTGGATGGAATAACAGTGTAGATCTAGATCCCAATAC
 GlnAlaLysAlaThrArgGluAlaGlnLysArgAlaAlaAlaGlyIleMetLysAsnProThrValAspGlyIleThrValIleAspLeuAspProIle>

 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400
 CCTATGATCCAAAGTTTGAAGCAGTTGGACACAGTAAATCTCTCTAGTCTCTCGGTGACCCCAAGTGTGATGATGATGAGGACTACCTGGGGCTTTGGTGA
 ProTyrAspProLysPheGluLysGlnLeuGlyGlnValMetLeuLeuValLeuCysValThrGlnValLeuMetMetArgThrThrTrpAlaLeuCysGlu>

 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500
 AGCCTTAACCTAGCAACTGGACCCGTGTCCACATTTGGGAAAGGAAATCCAGGAGATTTCTGGAACACAAACCATTGCGAGTGTCAATGGCAACATCTTT
 AlaLeuThrLeuAlaThrGlyProValSerThrLeuTrpGluGlyAsnProGlyArgPheTrpAsnThrThrIleAlaValSerMetAlaAsnIlePhe>

 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600
 AGAGGGAGTTACCTGGCTGGAGCTGGACTTCTCTTTTATCATGAAAGAACACACACCAGCAGGAGAGGAACTGGCAATATAGGAGAAACCGTTAGGAG
 ArgGlySerTyrLeuAlaGlyAlaGlyLeuLeuPheSerIleMetLysAsnThrThrSerThrArgArgGlyThrGlyAsnIleGlyGluThrLeuGly>

 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700
 AGAAATGGAAAAGCAGACTGAACGCATTTGGGAAAAGTGAATTCAGATCTACAAAAGTGGAAATTCAGAAGTGGACAGAACCTTAGCAAAAAGAAAGG
 GluLysTrpLysSerArgLeuAsnAlaLeuGlyLysSerGluPheGlnIleTyrLysLysSerGlyIleGlnGluValAspArgThrLeuAlaLysGluGly>

 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
 CATTAAAAGAGGAAACGGATCATCACCGTGTGCGAGGCTCAGCAAACTGAGATGCTTGAAGGAATTTGGTCCACACCAGAAAGGAAAGTA
 IleLysArgGlyGluThrAspHisHisAlaValSerArgGlySerAlaLysLeuArgTrpPheValGluArgAsnLeuValThrProGluGlyLysVal>

 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900
 GTGGACCTGGTTGCGCAGAGGGGGCTGGTCATACACTATTGTGGAGNTAAAGAATGTAAGAGAGTTAAAGGCTTAACAAAAGGAGGACCAGGACACCG
 ValAspLeuGlyCysGlyArgGlyGlyTrpSerTyrTyrCysGlyGlyLeuLysAsnValArgGluValLysGlyLeuThrLysGlyGlyProGlyHis>

 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000
 AAGAACCTATCCCTATGTCAACATATGGGTGGAATCTAGTACCGTACAGAGCGGAGTTGATGTTTTTTTTTCCACAGAAAGTGTGACACATGTT
 GluGluProIlePrometSerThrTyrGlyTrpAsnLeuValArgLeuGlnSerGlyValAspValPhePheValProGluLysCysAspThrLeuLeu>

8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100
 GTGTGACATAGGGAAATCACCACAAATCCCACGGTAGAAGCGGGACGAACACTCAGAGTCCTCAACCTAGTGGAAAAATGGCTGAACAATAACACCCCAA
 CysAspIleGlyGluSerSerProAsnProThrValGluAlaGlyArgThrLeuArgValLeuAsnLeuValGluAsnTrpLeuAsnAsnThrGln>

8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200
 TTTTGGCTAAAGTTCTTAACCCGTACATGCCCTCAGTCAATGAAAGAATGGAAACCTTACAACGGAAATACGGAGAGCCTTGGTGAGAAATCCACTCT
 PheCysValLysValLeuAsnProTyrMetProSerValIleGluArgMetGluThrLeuGlnArgLysTyrGlyAlaLeuValArgAsnProLeu>

8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300
 CACGGAAATCCACACATGAGATGTACTGGGTCCCAATGCTCCGGGAACATAGTGTCAATCAGTGAACATGATTTCAAGAATGCTGATCAACAGATTAC
 SerArgAsnSerThrHisGluMetTyrTrpValSerAsnAlaSerGlyAsnIleValSerSerValAsnMetIleSerArgMetLeuIleAsnArgPheThr>

8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
 TATGAGACACAAGAAGGCCACTATGAGCCAGATGTCGACCTCGAAGCGGAACCCGCAATATTGGAATTTGAAAGTGAACACACCCGAACTAGACATAATT
 MetArgHisLysLysAlaThrTyrGluProAspValAspLeuGlySerGlyThrArgAsnIleGlyIleGluSerGluThrProAsnLeuAspIleIle>

8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500
 GGGAAAAGAAATAGAAAAATAAAAACAAGAGCATGAAACCGTCATGGCACTATGATCAAGACCACCCTACAAAACATGGGCTTACCATGGCAGCTATGAAA
 GlyLysArgIleGluLysIleLysGlnGluHisGluThrSerTrpHisTyrAspGlnAspHisProTyrLysThrTrpAlaTyrHisGlySerTyrGlu>

8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600
 CAAAACAGACTGGATCAGCATCATCCATGGTGAACGGAGTAGTCAGATTGTCACAAAACCCCTGGGACGTTGTCCAATGGTGACACAGATGGCAATGAC
 ThrLysGlnThrGlySerAlaSerSerMetValAsnGlyValValArgLeuLeuThrLysProTrpAspValValProMetValThrGlnMetAlaMetThr>

8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700
 AGACACAACCTCTTTGGACAACAGCGGTCTTCAAAGAGAGAGGTGGATACGAGAACCCAAAGAACCCAAAAGAGGCACAAAAAACTAATGAAAAATCACG
 AspThrThrProPheGlyGlnGlnArgValPheLysGluLysValAspThrArgThrGlnGluProLysGluGlyThrLysLysLeuMetLysIleThr>

8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800
 GCAGAGTGGCTCTGGAAAGAACTAGGAAAGAAAAAGACACCTAGAAATGTGTACCAGAGAAGAATTCACAAAAAAGGTGAGAAGCAATGCAGCCTTGGGGG
 AlaGluTrpLeuTrpLysGluLeuGlyLysLysLysThrProArgMetCysThrArgGluGluPheThrLysLysValArgSerAsnAlaAlaLeuGly>

8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900
 CCATATTCACCGATGAGAACAAAGTGGAAATCCGGCGTGAAGCGTTGAAGATAGTAGTGGTTTGGAGCTGGTTGACAAGGAAAGAACCTCCATCTTGA
 AlaIlePheThrAspGluAsnLysTrpLysSerAlaArgGluAlaValGluAspSerArgPheTrpGluLeuValAspLysGluArgAsnLeuHisLeuGlu>

 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
 AGGAAATGTGAACAATGTGTATACATGATGGGAAAAGAGAGAAAATACTAGGAGAGTTTGGTAAGCAAAAAGGCAGAGCCATATGGTACATG
 GlyLysCysGluThrCysValThrAsnMetMetGlyLysArgGluLysLysLeuGlyGluPheGlyLysAlaLysGlySerArgAlaIleTrpTyrMet>

 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100
 TGGCTCGGAGCACCGTCTTAGAGTTTGAAGCCCTAGGATTTTGAATGAAGACCATTGGTTCTCCAGAGAGAACCTCCCTGAGTGGAGTGGAGGAGAAAG
 TrpLeuGlyAlaArgPheLeuGluPheGluAlaLeuGlyPheLeuAsnGluAspHisTrpPheSerArgGluAsnSerLeuSerGlyValGluGlyGlu>

 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200
 GGCTGCATAAGCTAGGTACATCTTAAGAGAGGTGAGCAAGAAAGAGGAGCAATGTATGCCGATGACACCGCAGGCTGGACACACAAGAAATCACAAT
 GlyLeuHisLysLysLeuGlyTyrIleLeuArgGluValSerLysLysGluGlyAlaMetTyrAlaAspAspThrAlaGlyTrpAspThrArgIleThrIle>

 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300
 AGAGGATTTGAAAAATGAAGAAATGATAACGAACCAATGGCAGGAGAACACAAGAACTTCCGAGGCCATTTTAAATTTGACGTACCAAAAACAAGGTG
 GluAspLeuLysAsnGluGluMetIleThrAsnHisMetAlaGlyGluHisLysLysLeuAlaGluAlaIlePheLysLeuThrTyrGlnAsnLysVal>

 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400
 GTCCGTGTCAAAAGACCACCAAGAGGCACAGTAATGGACATCATATCGAGAAGAGACCAAGGGTAGTGGACAAGTTGGCACCTATGGCCTCAACA
 ValArgValGlnArgProThrProArgGlyThrValMetAspIleIleSerArgArgAspGlnArgGlySerGlyGlnValGlyThrTyrGlyLeuAsn>

 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500
 CTTTCACCAACATGGAAGCACAACATAATAGGCAATGGAGGGGAAGGAATCTTCAAAGCATCCAGCACCTTGACAGCCTCAGAAGAAATCGCTGTGCA
 ThrPheThrAsnMetGluAlaGlnLeuIleArgGlnMetGluGlyGluGlyIlePheLysSerIleGlnHisLeuThrAlaSerGluGluIleAlaValGln>

 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600
 AGATTGGCTAGTAAGATAGGGCGTGAAGGTTGTCAAGAAATGGCCATCAGTGGAGATGATGTGTGTGAAACCTTAGATGATAGATTTGCCAAGAGCT
 AspTrpLeuValArgValGlyArgGluArgLeuSerArgMetAlaIleSerGlyAspAspCysValValLysProLeuAspAspArgPheAlaArgAla>

 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700
 CTAACAGCTCTAAATGACATGGAAAGGTTAGGAAGACATACAGCAATGGAGCCCTCAAGAGGATGGAAACGACTGGACGCGAGGTGCCCTTCTGTTCAC
 LeuThrAlaLeuAsnAspMetGlyLysValArgLysAspIleGlnGlnTrpGluProSerArgGlyTrpAsnAspTrpThrGlnValProPheCysSer>

9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800
 ACCATTTTCACGAGTTAATATGAAAGATGGTGGCACACTGTAAGTTCCATGCAGAAACCAGATGAATTGATCGGCAGAGCCCGAATTTCCCAGGGAGC
 HisHisPheHisGluLeuIleMetLysAspGlyArgThrLeuValValProCysArgAsnGlnAspGluLeuIleGlyArgAlaArgIleSerGlnGlyAla>

 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900
 TGGGTGGTCTTTACGGGAGACGGCCTGTTGGGAAGTCTTACGCCCAAAATGTGGAGCTTGATGTACTTCCACAGACGTGATCTCAGGCTAGCGGCAAAAT
 GlyTrpSerLeuArgGluThrAlaCysLeuGlyLysSerTyrAlaGlnMetTrpSerLeuMetTyrPheHisArgAspLeuArgLeuAlaAlaAsn>

 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000
 GCCATCTGCTCGGCAGTCCCATCACACTGGATTCCAACAGCCGGACAACCTGGTCCATACACGCCAGCCATGAAATGGATGACGACGCGAAGACATGTTGA
 AlaIleCysSerAlaValProSerHisTrpIleProThrSerArgThrTrpSerIleHisAlaSerHisGluTrpMetThrTrpGluAspMetLeu>

 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100
 CAGTTTGGAAACAGAGTGTGGATCCTAGAAAATCCATGGATGGAAGACAAAACCTCCAGTGGAAATCATGGAGGAAATCCCATACCTGGGAAAAGAGAAGA
 ThrValTrpAsnArgValTrpIleLeuGluAsnProTrpMetGluAspLysThrProValGluSerTrpGluGluIleProTyrLeuGlyLysArgGluAsp>

 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200
 CCAATGGTGGCTCGTGTGATGGCTGACAAGCAGACCCACCTGGCGAAGAAATCCAGACAGCAATAAACCAAGTCAGATCCCTCATTTGGCAATGAG
 GlnTrpCysGlySerLeuIleGlyLeuThrSerArgAlaThrTrpAlaLysAsnIleGlnThrAlaIleAsnGlnValArgSerLeuIleGlyAsnGlu>

 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300
 GAATACACAGATTACATGCCATCCATGAAAAGATTCAGAAGAGAGGAAAGAGGAGGAGGTTTGTGGTAGAAAAACATGAAACAAAACAGAAAGTCAGG
 GluTyrThrAspTyrMetProSerMetLysArgPheArgArgGluGluGluAlaGlyValLeuTrp***>

 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400
 TCGGATTAAGCCATAGTAGGGAAAACTATGTACTCTGTGAGCCCGTCCAAAGACGTTAAAGAAGTCAGGCCATTTTGATGCCATAGCTTGAGCAA

 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500
 CTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAAATCCGGGAGGCCACAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCGTAGTGACTAGCGGTTAGAGGA

 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600
 GACCCCTCCCTTACAGATCCAGCAACAATGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAAAA

10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700
 CAAAACAGCATATGACCGTGGGAAAGACCAGAGATCCCTGCTCCTCAGCATCATCCAGGCACAGGACCCAGAAAATGGAATGGTGTGTGGA
 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800
 ATCAACAGGTTCTGGTACCGGTAGGCATCGTGGTGTCAAGTCCGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCCAAACGATCAAGGCGAGTTACATG
 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900
 ATCCCCCATGTTGTCAAAAAGCGGTTAGTCTTCGGTCCCTCCGATCGTGTTCAGAAAGTAACTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCA
 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000
 CTGCATAATTCCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAAATAGTATGCGGCGACCGA
 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100
 GTTGCTCTTGCCCGGCTCAACACGGGATAATAACCGCCGACATAGCAGAACCTTAAAGTGTCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCGGGCGAAAACCTCTC
 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200
 AAGGATCTTACCGCTGTTGAGTCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA
 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300
 AAAACAGGAAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATCTCATACTCTTCTTCTTCAATATTTGAAGCATTTTATC
 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400
 AGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTGAAATGTAATTTAGAAAATAAACAAATAGGGTTCGGGCACATTTCCCGGAAAAGTGCACCTGACCT
 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500
 CTAAGAAACCATTTATATGACATTAACCTATAAAAATAGCGGTATCACGAGCCCTTTCGTCTTCAAGAAATCTCAATGTTTGACAGCTTATCATCGA
 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600
 TAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATACACAGTTAAAATGTTAAACGACGTCAGGCACCGTGTATGAARCTAACAATGGCTCATCGTCACTCCCTCGGCACCCGTC
 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700
 ACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGTACTGCCGGCCCTCTTGGGGATATCGTCCATTCGGACAGCATGCCAGTCACTATGGCGTGC
 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800
 TGCTGGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCCGTTCTCGGAGACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCCGCCAGTCCCTGCTCGCTTCCGCTACT

11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900
 TGGAGCCACTATCGACTACCGGATCATGGGACACACCCGTCCTGTGGATCCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATACCCGGCCACAGGTGGC
 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000
 GTTGTGGCCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCC
 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100
 CCGTGGCCGGGACTGTTGGGGCCACTCCTCTGCATGCACCAATTCCTTGGGGCGGTGCTCAACGGCCCTCAACCCTACTACTGGGCTGCTTCCCTAAT
 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200
 GCAGGATCGCAFAAGGGAGAGCGTGCACCGATGCCCTTGAGAGCCCTTCAACCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGCCGGGGCATGACTATCGTCCGCCGA
 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300
 CTTATGACTGTCTTCTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTGGCGGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGGACGATGA
 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400
 TCGGCCCTGTCCGCTTTCGGTATTTCGGAACTTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTACTGGTCCCGCCACCAACGTTTTCCGGGAGAGCAGGCCATTAT
 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500
 CGCCGGCATGGCCCGACGGCTGGGCTACGCTTCTGTGGCTTCGGACGGAGGCTGGATGGCTTCCCATTATGATTTCTTCTCGCTTCCGGCGGGC
 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600
 ATCGGGATCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGTAGACGACCAATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTTTACCAGCCTAACCTT
 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700
 CGATCACTGGACCGCTGATCGTCAAGGCGATTTATGCCGCTCGCGAGCACATGGAAACGGGTTGGCATGGATTTAGGGCCGCCCTATACCCTTGTCTG
 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800
 CCTCCCGGTTCCGTCGGGTGCATGGAGCCGGCCACCTCGACTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACCACCTCCAAGAAATTTGGAG
 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900
 CCAATCAATTTCTGGGGAGAACTGTGAATGGCCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCAATCTCCAGCAGCCGACGGGGGGCATCTC

14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200
 TTTCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCGGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGGTGGCTTTCTC
 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300
 ATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGCTCCTCAAGTGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATC
 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400
 CCGTAACTATCGTCTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCCACTGGTAACAGGATAGCAGAGCGGAGGTATGTAGGCGGT
 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500
 GCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGGCTCTGTCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600
 TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTCGCAAGCAGCAGATTACGGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700
 TCCTTTGATCTTTTCTPACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAGGAAAACTCACGTTAAGGATTTTGGTTCATGAGATPATCAAAAAAGGATCTTCACCTAGATC
 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800
 CTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTTAATCAATCTAAAGTATATATGATYAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900
 CGATCTGTCTATTTTCGTTTCAATCCATAGTTGCCCTGACTCCCGGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTCTGCAATGAT
 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000
 ACCCGGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCCGGAGGSCCGAGCGCAGAGTGGTCCCTGCAACTTTTATCCGCCCTCC
 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100
 ATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGGCATTGCTGCAAGATCTGGCTAGCGAT
 15110 15120 15130 15140 15150
 GACCTGTGATTTGGTTCGCTGACCAATTCGGGGCGCCGATTTAGGTGACACTATAG

APÉNDICE 2

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido p3 de ADNc de DEN3 (Sieman/78)

Bases 1 a 10707: ADNc del genoma del virus DEN3

Bases 95 a 10264: ORF de la poliproteína de DEN3

Bases 95 a 436: ORF de la proteína C

Bases 437 a 934: ORF de la proteína prM

Bases 935 a 2413: ORF de la proteína E

Bases 2414 a 3469: ORF de la proteína NS1

Bases 3470 a 4123: ORF de la proteína NS2A

Bases 4124 a 4513: ORF de la proteína NS2B

Bases 4514 a 6370: ORF de la proteína NS3

Bases 6371 a 6751: ORF de la proteína NS4A

Bases 6752 a 6820: ORF de la proteína 2K

Bases 6821 a 7564: ORF de la proteína NS4B

Bases 7575 a 10264: ORF de la proteína NS5

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AGTTTGTAGTCTACGTTGGACCGACAGAACAGTTTCGACTCGGAAGCTTTCGCTTAACGTTAGTACTGACAGTTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGTGATGAAC
MetAsn>

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AACCAACGGAAAAAGACGGGAAAACCGTCTATCAATATGCTGAACCGGTGAGAAAACCGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAG
AsnGlnArgLysLysThrGlyLysProSerIleAsnMetLeuLysArgValAlaArgAsnArgValSerThrGlySerGlnLeuAlaLysArgPheSerArg>

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACTGCTGAACGGCCCAAGGACCAATGAAATTGGTTATGGCGTTTCATAGCTTTCCTCAGATTTCTAGCCATTCCACCGACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATG
GlyLeuLeuAsnGlyGlnGlyProMetLysLeuValMetAlaPheIleAlaPheLeuArgPheLeuAlaIleProProThrAlaGlyValLeuAlaArgTrp>

```

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GGGAACTTTAAGAAGTCGGGGCTATTAAAGTCTGAGAGGCTTCAAGAGAGGAGATCTCAACATCTGCTGAGCAITATCAACAGACGGAAAAGACATCG
 GlyThrPheLysSerGlyAlaIleLysValIleLysValIleLysGlyPheLysLysGluIleSerAsnMetLeuSerIleIleAsnArgArgLysLysThrSer>

 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CTCTGTCTCATGATGATGATACAGCAACACTTCTTCCACTTGCATTCACGAGATGGAGACCGCGCATGATTTGGGGAAGATGAAGAGGAAAT
 LeuCysLeuMetMetLeuProAlaThrLeuAlaPheHisLeuThrSerArgAspGlyGluProArgMetIleValGlyLysAsnGluArgGlyLys>

 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CCTACTTTTTAAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCCATGGATTTGGAGAGATGTGTGATGACACGGTACCTACAAATGCCCCCT
 SerLeuLeuPheLysThrAlaSerGlyIleAsnMetCysThrLeuIleAlaMetAspLeuGlyGluMetCysAspAspThrValThrTyrlLysCysProLeu>

 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 CATTACTGAAGTGGAGCCCTGAAGACATTCAGTCTGTGGTGCACACTTACATCGACATGGTGACCTACCGAACGTGCAATCAAGCTGGAGACACAGACGC
 IleThrGluValGluProGluAspIleAspCysTrpCysAsnLeuThrSerThrTrpValThrTyrlLysThrCysAsnGlnAlaGlyGluHisArgArg>

 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GACAAAAGATCGTGGCTTAGTCTCCCATGTCCGATGGACTGGACACACGCCAACCTGGANSTCGGTGAAGGACTTGGAGACAGGTTCGAGA
 AspLysArgSerValAlaLeuAlaProHisValGlyMetGlyLeuAspThrArgThrGlnThrTrpMetSerAlaGluGlyAlaTrpArgGlnValGlu>

 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 AGGTAGACACTGGCCCTTAGGCCACCCAGGTTCAAACTAGCCCTATTTCTTGGCCATACATAGGCACCTTCTTGACCCAGAAAAGTGGTTATTTT
 LysValGluThrTrpAlaPheArgHisProGlyPheThrIleLeuAlaLeuPheLeuAlaHisTyrlLysThrSerLeuThrGlnLysValValIlePhe>

 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CATACTACTAATGCTGGTCACCCCATCCATGACAATGAGATCGTGGAGTAGGAACACAGAGATTTTGTGGAGGCCCTATCAGGAGCTAGCTGGGTGAC
 IleLeuLeuMetLeuValThrProSerMetThrMetArgCysValGlyValGlyAsnArgAspPheValGluGlyLeuSerGlyAlaThrTrpValAsp>

 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 GTGGTCTCGAGCACGGTGGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAGCCACCGCTGGATATAGACTCCAGAAAGACCGGCCACCCCAACTGGCGACCC
 ValValLeuGluHisGlyGlyCysValThrThrMetAlaLysAsnLysProThrLeuAspIleGluLeuGlnLysThrGluAlaThrGlnLeuAlaThr>

 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TAAGGAACCTATGATTGAGGGGAAAATTTACCAACGTAAACCCGACTCAAGGTGCCCCACCCAGGGGAAGCGATTTTACTGAGGACGAGCAGGACAGAA
 LeuArgLysLeuCysIleGluGlyLysIleThrAsnValThrThrAspSerArgCysProThrGlnGlyGluAlaIleLeuProGluGluGlnAspGlnAsn>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 CCACGTTGCAAGCACACATACGTGGACAGAGCTGGGAAACGGTTGTGGTTTGGCAAGGAAGCCTGGTAACATGGCGGAATTTCAATGTTTG
 .HisValCysLysHisThrTyrValAspArgGlyTrpGlyAsnGlyCysGlyLeupheGlyLysGlySerLeuValThrCysAlaLysPheGlnCysLeu>
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 GAATCAATAGAGGAAAAGTGGTGCAGCATGAGAAACCTCAAATACACCGTCATCAACACAGTCACACAGGAGATCAACACCAGGTGGGAAATGAACGC
 GluSerIleGluGlyLysValValGlnHisGluAsnLeuLysTyrThrValIleIleThrValHisThrGlyAspGlnHisGlnValGlyAsnGluThr>
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AGGAGTCACGGCTGAGATAACACCCAGGCATCAACCGTTGAGCCATCTTACCTGAATATGGAACCCCTGGGCTAGAATGCTCACCACGGACAGGTTT
 GlnGlyValThrAlaGluIleThrProGlnAlaSerThrValGluAlaIleLeuProGluTyrGlyThrLeuGlyLeuGluCysSerProArgThrGlyLeu>
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 AGATTTCAATGAAATGATTTTGTGACRAATGAAGAACAAGCATGGATGGTACATAGACAAATGGTTTTTGGACCTACCTTACCATGGACATCAGGAGCT
 AspPheAsnGluMetIleLeuLeuThrMetLysAsnLysAlaTrpMetValHisArgGlnTrpPheAspLeuProLeuProTyrThrSerGlyAla>
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 ACAACAGAAACACCAACCTGGAATAAGAAAAGAGCTTCTTGTGACATTCAAAACCGCACATGCAAAAAGCAAGTAGTAGTCCCTTGGATCGCAAGAGG
 ThrThrGluThrProThrTrpAsnLysLysGluLeuLeuValThrPheLysAsnAlaHisAlaLysLysGlnGluValValLeuGlySerGlnGlu>
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GAGCAATGCACACAGCACTGACAGGACTACAGAGATCCAAACCTCAGGAGGCACAAAGTATTTTTGGGGGCGACTTAAATGTAGACTCAAGATGGACAA
 GlyAlaMetHisThrAlaLeuThrGlyAlaThrGluIleGlnThrSerGlyGlyThrSerIlePheAlaGlyHisLeuLysCysArgLeuLysMetAspLys>
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 ATTGGAACTCAAAGGGGATGAGCTATGCAATGTGCTTGAATGCTTTGTGTTGAAGAAAGAGTCTCCGAAACCGCAACATGGGACAATACTCATCAAGGTT
 LeuGluLeuLysGlyMetSerTyrAlaMetCysLeuAsnAlaPheValLeuLysLysGluValSerGluThrGlnHisGlyThrIleLeuIleLysVal>
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 GAGTACAAAGGGGAAGATGCACCTTGCAAGATTCCTTCTCCACGGAGGATGGACAAGGAAAGCCCAATGGCAGACTGATCACAGCTAACCCAGTGG
 GluTyrLysGlyGluAspAlaProCysLysIleProPheSerThrGluAspGlyGlnGlyLysAlaHisAsnGlyArgLeuIleThrAlaAsnProVal>

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TGACCAAGAGGAGGAGCCTGTCAATATTGAGGCAGAACCTCCCTTTTGGGAAGCCAAATATAGTAATTGGAATTTGGAGACAAAGCCTTGAAAATCAACTG
 ValThrLysLysGluGluProValAsnIleGluAlaGluProPheGlyGluSerAsnIleValIleGlyIleGlyAspLysAlaLeuLysIleAsnTrp>

 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 GTACAAAGGGGAAGCTCGATTGGGARGATGTTGAGGCCACTGCCAGAGGTCAAGCGCATGGCCATCTTGGAGACACAGCCCTGGGACTTTGGATCA
 TyrLysLysGlySerSerIleGlyLysMetPheGluAlaThrAlaArgGlyAlaArgArgMetAlaIleLeuGlyAspThrAlaTrpAspPheGlySer>

 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 GTAGGTGGTGTTTTAAATTCATTAGGAAAATGGTGCACCAAAATTTGGAAAGTGTACACAGCCCTATTTAGTGGAGTCTCCCTGGATAATGAAAATTG
 ValGlyGlyValLeuAsnSerLeuGlyLysMetValHisGlnIlePheGlySerAlaTyrThrAlaLeuPheSerGlyValSerTrpIleMetLysIle>

 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GAATAGGTGTCCTTTAAACCTGGATAGGGTTGAATTCAAAAAACACTAGTATGAGCTTTAGCTGCATTTGTAGTAGGAATCATTACACTCTATCTGGGAGC
 GlyIleGlyValLeuLeuThrTrpIleGlyLeuAsnSerLysAsnThrSerMetSerPheSerCysIleValIleGlyIleIleThrLeuTyrLeuGlyAla>

 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 CGTGTGCAAGCTGACATGGGTGTGTCATAAACTGGAAGCAAGAACTCAATGGAAGTGGAAATTTCCCTCACTAATAGGTCCACACCTGGACACA
 ValValGlnAlaAspMetGlyCysValIleAsnTrpLysGlyLysGluLeuLysCysGlySerGlyIlePheValThrAsnGluValHisThrTrpThr>

 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 GAGCAATACAAATTCAGCAGACTCCCCAAAAGACTGGCGACAGCCATTCAGCGCCTTGGGAGAAATGGAGTGTGGGAATCAGGTCGACAAACAGAA
 GluGlnTyrLysPheGlnAlaAspSerProLysArgLeuAlaThrAlaIleAlaGlyAlaTrpGluAsnGlyValCysGlyIleArgSerThrThrArg>

 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 TGGAGAACCTCTTGTGGAGCAAAATAGCCAAATGAACCTGAACTACATATTTATGGGAAAACAACATCAAATTAACGGTAGTTGTGGTGATATAATTTGGGT
 MetGluAsnLeuLeuTrpLysGlnIleAlaAsnGluLeuAsnTyrIleLeuTrpGluAsnAsnIleLysLeuThrValValGlyAspIleIleGlyVal>

 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 CTTAGAGCAAGGAAAAGAACACTAACACCCATGGAACTAAAATATTCATGGAAAACATGGGAAAGCCGAAAGATAGTACAGCTGAAAACACAA
 LeuGluGlnGlyLysArgThrLeuThrProGlnProMetGluLeuLysTyrSerTrpLysThrTrpGlyLysAlaLysIleValThrAlaGluThrGln>

 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 AATTCCTCTTTTCATAATAGATGGGCCAAACACACAGAGTGTCCCAAGTGCCTCAAGAGCATGGAATGTGTGGAGGTGAAGATTACGGGTTCCGGAGTCT
 AsnSerSerPheIleIleAspGlyProAsnThrProGluCysProSerAlaSerArgAlaTrpAsnValTrpGluValGluAspTyrGlyPheGlyVal>

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 TCACAACTAACAATATGGCTGAACTCCGAGAGATGTACACCCCACTATGTGACCACAGGCTAATGTGGCAGCCGTTAAGATGAGAGGGCCGTACACGC
 PheThrThrAsnIleTyrTrpLeuLysLeuArgGluMetTyrThrGlnLeuCysAspHisArgLeuMetSerAlaAlaValLysAspGluArgAlaValHisAla>

 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 CGACATGGCTATTGGATAGAAAGCCAAAGAATGGAAGTTGGAAGCTAGAAAAGGCATCCCTCATAGAGGTAATAACCTGCACATGGCCAAAATCACAC
 AspMetGlyTyrTrpIleGluSerGlnLysAsnGlySerTrpLysLeuGluLysAlaSerLeuIleGluValLysThrCysThrTrpProLysSerHis>

 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 ACYCTTTGGAGCAATGGTGTCTAGAGAGTGACATGATCATCCCAAGAGTCTGGCTGGTCCCATTTGGCAACACAACACTACAGCCCGGATACCACACCC
 ThrLeuTrpSerAsnGlyValLeuGluSerAspMetIleIleProLysSerLeuAlaGlyProIleSerGlnHisAsnTyrArgProGlyTyrHisThr>

 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 AAACGGCAGGACCCCTGGCACCTTAGGAAAATTTGGAGCTGGACTTCAACTATTGTGAAGGAACAACAGTTGTTCATCACAGAAAATTTGTGGACAAGAGGCC
 GlnThrAlaGlyProTrpHisLeuGlyLysLeuGluLeuAspPheAsnTyrCysGluGlyThrThrValValIleThrGluAsnCysGlyThrArgGlyPro>

 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 ATCACTGAGAACAAACACAGTGTACAGGAAGTTGATACACGGAATGGTGTGGCTCGTGTACACTTCTCCCTGCGATACATGGGAGAAAGCGGCTGC
 SerLeuArgThrThrThrValSerGlyLysLeuIleHisGluTrpCysCysArgSerCysThrLeuProProLeuArgTyrMetGlyGluAspGlyCys>

 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 TGGTATGGCATGGAATTAGACCCATTAATGAGAAAGAGAAACATGGTAAAGTCTTTAGTCTCAGCAGGGAGTGGAAAGGTGGATAACTTCACAATGG
 TrpTyrGlyMetGluIleArgProIleAsnGluLysGluGluAsnMetValLysSerLeuValSerAlaGlySerGlyLysValAspAsnPheThrMet>

 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 GTGTCTTGTGTTGGCAATCCTTTTGAAGAGGTGATGAGAGGAAAATTTGGGAAAAGCACATGATTCAGGGGTTCTCTTCACGTTTGTACTCCTTCT
 GlyValLeuCysLeuAlaIleLeuPheGluGluValMetArgGlyLysPheGlyLysLysHisMetIleAlaGlyValLeuPheThrPheValLeuLeuLeu>

 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
 CTCAGGCAAAATAACATGGAGAGACATGGCGCACACACTCAATAATGATGGGTCCACCCCTCTGACAGAAATGGGAATGGCGTCACTTACCTAGCATTG
 SerGlyGlnIleThrTrpArgAspMetAlaHisThrLeuIleMetIleGlySerAsnAlaSerAspArgMetGlyMetGlyValThrTyrLeuAlaLeu>

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
 ATTGCAACATTTAAATAATTCAGCCATTTTGGCTTTGGGATTCCTCGAGAAACTGACATCTAGAGAAAATTTATTGTGGGAGTTGGGTGGCCATGG
 IleAlaThrPheLysIleGlnProPheLeuAlaLeuGlyPhePheLeuArgLysLeuThrSerArgGluAsnLeuLeuGlyValGlyLeuAlaMet>
 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 CAACAACGTTACAACTGCCAGAGGACATTTGAACAAATGGCAATAGCTTTAGGGCTCATGGCTCTTAAATTAATAACACAAATTTGAAACATACCA
 AlaThrThrLeuGlnLeuProGluAspIleGluGlnMetAlaAsnGlyIleAlaLeuGlyLeuMetAlaLeuLysLeuIleThrGlnPheGluThrTyrGln>
 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
 ACTATGGACGGCATTAGTCTCCATAATGTGTTCAAAATACAAATTTACGTTGACTGTGGCTGGAGAACAGCCACCCCTGATTTGGCCGGAATTTCTCTT
 LeuTrpThrAlaLeuValSerLeuMetCysSerAsnThrIlePheThrLeuThrValAlaAlaTrpArgThrAlaThrLeuIleLeuAlaGlyIleSerLeu>
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
 TTGCCAGTGTCCAGTCTTCGAGCATGAGGAAACAGATTGGCTCCCAATGGCTGGCAGCTATGGGAGTTCCACCCCTACCCTTTTATTATTTTCAGTT
 LeuProValCysGlnSerSerMetMetArgLysThrAspTrpLeuProMetAlaValAlaAlaMetGlyValProLeuProLeuPheIlePheSer>
 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 TGAAGATACGCTCAAAGGAGAGCTGGCCACTGAATGAGGGGTGATGGCTGTGGACTTGGCTGTGGAGTATTTCTAGCTAGTTCTCTCCTTAGGAATGACGT
 LeuLysAspThrLeuLysArgArgSerTrpProLeuAsnGluGlyValMetAlaValIleLeuAlaSerSerLeuLeuArgAsnAspVal>
 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
 GCCCATGGCTGGACCATTTAGTGGCTGGGGCTTGTCTGATAGCTGCTACGTCATACTGGCAGCTCAGCAGACTCTGTAGAAAAAGCAGCAGATGTG
 ProMetAlaGlyProLeuValAlaGlyGlyLeuLeuIleAlaCysTyrValIleThrGlyThrSerAlaAspLeuThrValGluLysAlaAlaAspVal>
 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
 ACATGGCAGGAAGGCTGAGCAACAGGAGTGTCCACAATTTAATGATCACAGTTGATGACGATGGAACAATGAGATATAAAGATGATGAGACTGAGA
 ThrTrpGluGluAlaGluGlnThrGlyValSerHisAsnLeuMetIleThrValAspAspAspGlyThrMetArgIleLysAspAspGluThrGlu>
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 ACATCTAACAGTGTCTTTGAAAACAGCATTTACTAATAGTGTGAGGCATTTTCCATACTCCATCCCGCAACACTGTTGGTCTGGCACACTTGGCAAAA
 AsnIleLeuThrValLeuLeuLysThrAlaLeuLeuIleValSerGlyIlePheProTyrSerIleProAlaThrLeuLeuValTrpHisThrTrpGlnLys>
 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
 GCAAAACCAAGATCCGGTCTCCTATGGACGTTCCAGCCCCCAGAGACACAGAAAGCAGAACTGGAAGGGGTTTATAGATCAAGCAGCAAGGA
 GlnThrGlnArgSerGlyValLeuTrpAspValProSerProGluThrGlnLysAlaGluLeuGluGlyValTyrArgIleLysGlnGlnGly>

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
 ATTTTGGAAAACCCAAAGTGGGGTTGGAGTACAAAAAGAGGAGTTCACACCATGTGGCACCAAGAGGAGCAGTGTGACACACACAATGGGA
 IlePheGlyLysThrGlnValGlyValGlyValGlnLysGlnGlyValPheHisThrMetTrpHisValThrArgGlyAlaValLeuThrHisAsnGly>
 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 AAAGACTGGAACCAACTGGCTAGCGTGAANAAGATCTGTATTCATACGGAGGAGTGGAAATTTAGTGCACAATGGCAAAAAGGAGAGGAGGTGCA
 LysArgLeuGluProAsnTrpAlaSerValLysLysAspLeuIleSerTyrglyGlyGlyTrpLysLeuSerAlaGlnTrpGlnLysGlyGluGluValGln>
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 GGTATTCCGTAGAGCCTGGGAGAACCCAAAGAACTTTCAAAACCATGCCAGGCATTTCCAGACAACAACAGGGGAGATAGGAGCGGATTCACACTGGAC
 ValIleAlaValGluProGlyLysAsnProLysAsnPheGlnThrMetProGlyIlePheGlnThrThrGlyGluIleGlyAlaIleAlaLeuAsp>
 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
 TTCAAGCCTGGAACCTCAGGATCTCCCATCAATAAACAAGAGGAAAGGTACTGGATTGTATGGCAATGGAGTGGTCACAAAAGAATGGTGGCTATGTCA
 PheLysProGlyThrSerGlySerProIleIleAsnArgGluGlyLysValLeuGlyLeuTyrglyAsnGlyValValThrLysAsnGlyGlyTyrrVal>
 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 GTGGAATAGCACAAAACAAATGCAGAACCCAGACCGGACCCGACACCAGAGTTGGAAGAGAGATGTTCAAAAAGCGAAATCTAACCCATAATGGATCTCCATCC
 SerGlyIleAlaGlnThrAsnAlaGluProAspGlyProThrProGluLeuGluGluMetPheLysLysArgAsnLeuThrIleMetAspLeuHisPro>
 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200
 CGGTCAGGAAAGACCGGAAATATCTTCCAGCTATTGTTAGAGAGCAATCAAGAGACGCTTAAGGACTTAATTTGGCACCAACAAGGGTAGTTGCA
 GlySerGlyLysThrArgLysTyrrLeuProAlaIleValArgGluAlaIleLysArgArgLeuArgThrLeuIleLeuAlaProThrArgValValAla>
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300
 GCTGAGATGGAGAAGCATTGAAAGGGCTCCCAATAAGGTATCAAAACAACCTGCAACAATACTGAACACACAGGGGAGAGATTTGTGATCTAATGTGCC
 AlaGluMetGluGluAlaLeuLysGlyLeuProIleArgTyrrGlnThrAlaThrLysSerGluHisThrGlyArgGluIleValAspLeuMetCys>
 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 ACCGACGTTCACAATGCGTTTGCTGTCCACAGTCAGGGTTCCAAACTACAACCTTGATAATAATGATGAGGCTCATTTCCACAGCCAGCCAGTATAGC
 HisAlaThrPheThrMetArgLeuLeuSerProValArgValProAsnTyrrAsnLeuIleIleMetAspGluAlaHisPheThrAspProAlaSerIleAla>

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500
 GGCTAGAGGGTACATATCAACTCGTGTAGGAATGGAGAGGCGCCGCAATTTCAIGACAGCCACACCCCTGGAAACAGCTGATGCCCTTCCTCAGAGC
 AlaArgGlyTyrIleSerThrArgValGlyMetGlyGluAlaAlaIlePheMetThrAlaThrProProGlyThrAlaAspAlaPheProGlnSer>

 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600
 AACGCTCCAATCAAGATGAAGAAGAGACATACCAGAACGCTCATGGAAATTCAGGCAATGAATGGATACCAGACTTTGCCGGGAAGACGGTGTGGTTTG
 AsnAlaProIleGlnAspGluGluArgAspIleProGluArgSerTrpAsnSerGlyAsnGluTrpIleThrAspPheAlaGlyLysThrValTrpPhe>

 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 TCCCTAGCATCAAAGCTGGAAATGACATAGCAAACTGCTTGGGAAAATAATGGAAAAAGGTCATTTCAACTTAGGAAGACTTTTGACACAGAAATATCA
 ValProSerIleLysAlaGlyAsnAspIleAlaAsnCysLeuArgLysAsnGlyLysValIleGlnLeuSerArgLysThrPheAspThrGluTyrGln>

 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800
 AAAGACTAAACTAAATGATGGGACTTTGTGTGACAAACAGACATTTAGAAATGGAGCCAAATTTCAAAGCAGACAGAGTGCATCGCCCAAGAAGATGT
 LysThrLysLeuAsnAspTrpAspPheValValThrThrAspIleSerGluMetGlyAlaAsnPheLysAlaAspArgValIleAspProArgArgCys>

 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900
 CTCAAGCCAGTGTATTTGACAGAGCGCCGCGGTGATCCTGGGGACCAATGCCAGTCCCGTAGCCGCTCGCCAAAGGAGAGGAGAGTTG
 LeuLysProValIleLeuThrAspGlyProGluArgValIleLeuAlaGlyProMetProValThrValAlaSerAlaAlaGlnArgArgGlyArgVal>

 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
 GCAGGAACCCCAAAAAGAAAATGACCAATACATATTCATGGCCAGCCCTCAATATGATGAAGACCAATGTCACCTGGACAGAAAGCAAAAATGCTGCT.
 GlyArgAsnProGlnLysGluAsnAspGlnTyrIlePheMetGlyGlnProLeuAsnAsnAspGluAspHisAlaHisTrpThrGluAlaLysMetLeuLeu>

 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100
 AGACAACATCAACACACAGAGGGATCATACCAGCTCTCTTTGAACCCAGAARGGGAGAAAGTCAGCCGCCATAGACGGCGAATACCGCTGAAGGGTGAG
 AspAsnIleAsnThrProGluGlyIleIleProAlaLeuPheGluProGluArgGluLysSerAlaAlaIleAspGlyGluTyrArgLeuLysGlyGlu>

 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200
 TCCAGGAAGACCTCGTGGAACTCATGAGGAGGGGTGACCTCCAGTTGGCTAGCCCATAAAGTAGCATCAGAAGGGATCAAATATACAGATAGAAAGT
 SerArgLysThrPheValGluLeuMetArgArgGlyAspLeuProValTrpLeuAlaHisLysValAlaSerGluGlyIleLysTyrThrAspArgLys>

 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300
 GGTGTTTTGATGGAGAACCAACAATCAAAATTTAGAGGAGAAATATGGATGTGGAAATCTGGACAAAGGAGGAGAAAAGAAAATTTGAGACCTAGGTG
 TrpCysPheAspGlyGluArgAsnAsnGlnIleLeuGluGluAsnMetAspValGluIleTrpThrLysGluGlyLysLysLysLeuArgProArgTrp>

6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400
 GCTTGATGCCCGCACCTTATTTCAGATCCCTTAGCGCTCAAGGAATTCAGGACTTTGCGGTGTTAGAAAGTCAATTTGCCCTTGATCTTTGTGACAGAAATA
 LeuAspAlaArgThrTyrSerAspProLeuAlaLeuLysGluPheLysAspPheAlaAlaGlyArgLysSerIleAlaLeuAspLeuValThrGluIle>

 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500
 GGAAGACTGCCCTTACACTTAGCTCACAGAACGAGAAACGCCCTGGACAACTGGTGTGATGTTGCACACAGTCCAGAACATGGCGGGAGGGCCCTACAGGCATG
 GlyArgValProSerHisLeuAlaHisArgThrArgAsnAlaLeuAspAsnLeuValMetLeuHisThrSerGluHisGlyGlyArgAlaTyrArgHis>

 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
 CAGTGGAGAACTACCAGAAACAATGGAAACACTTCTACTCCTGGGACTCATGATCCTGTTAACAGGTGGAGCAATGCTTTTCTTGATATCAGGTAAGG
 AlaValGluGluLeuProGluThrMetGluThrLeuLeuLeuLeuGlyLeuMetIleLeuLeuThrGlyGlyAlaMetLeuPheLeuIleSerGlyLysGly>

 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700
 GATTGGAAGACTTCAATAGGACTCATTGTGTAGCTGCTTCCAGCGGTATGTTATGGATGGCTGATGTCCTCCACTCCAATGGATCGGTCTGCCATAGTC
 IleGlyLysThrSerIleGlyLeuIleCysValAlaAlaSerSerGlyMetLeuThrMetAlaAspValProLeuGlnTrpIleAlaSerAlaIleVal>

 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800
 CTGGAGTTTTTATGATGGTGTACTTATACCAGAACCCAGAAAGCAGAGAACTCCCCAAGACAACTCAACTCGCATATGTCGTGATAGGCATACACAC
 LeuGluPhePheMetMetValLeuLeuIleProGluProGluLysGlnArgThrProGlnAspAsnGlnLeuAlaTyrValIleGlyIleLeuThr>

 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900
 TGGCTGCAATAGTAGCAGCCAAATGAAATGGACTGTTGGAAACCAAAAGAGAGATTAGGAATGTCCAAAGAACCCAGGTGTTGTTTCTCCAACCCAGCTA
 LeuAlaAlaIleValAlaAlaAsnGluMetGlyLeuLeuGluThrThrLysArgAspLeuGlyMetSerLysGluProGlyValValSerProThrSerTyr>

 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000
 TTTGGATGTGGACTTGCACCCAGCATCAGCCTGGACATTTGTACGCTGTGCCACACAGTAATACACCCTAATACACCAATGTGAGACATACCATAGAGAATCCACA
 LeuAspValAspLeuHisProAlaSerAlaTrpThrLeuTyrAlaValAlaThrThrValIleThrProMetLeuArgHisThrIleGluAsnSerThr>

 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100
 GCAATGTGCTCCCTGGCAGCTATAGCCAAACCAGGCAGTGGTCTCTGATGGTTTTAGACAAAGGATGGCCGATATCGAAATGGACTTAGCGGTGCCACTAT
 AlaAsnValSerLeuAlaAlaIleAlaAsnGlnAlaValValLeuMetGlyLeuAspLysGlyTrpProIleSerLysMetAspLeuGlyValProLeu>

7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
 TGGCACTGGGTTGTTATTTCACAAAGTGAACCCCACTAACTCTCACAGCGGCAGTTCTCCTGCTAGTCACGCATTTATGCTATTATAGTCCAGGATTCAGGC
 LeuAlaLeuGlyCysTyrSerGlnValAsnProLeuThrLeuAlaAlaValLeuLeuValThrHisTyrAlaIleIleGlyProGlyLeuGlnAla>

 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300
 AAAAGCCACTCGTGAAGCTCAAAAAGGACAGCTGCTGGATTAATGAAGATCCAAAGGTGGATGGATAATGACAAATAGACCTAGATCCCTGTAATATAC
 LysAlaThrArgGluAlaGlnLysArgThrAlaAlaGlyIleMetLysAsnProThrValAspGlyIleMetThrIleAspLeuAspProValIleTyr>

 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400
 GATTCAAAATTGAAAAGCAACTAGCACAGGTTATGCTCCCTGGTCTGTCAGTTCAACTTTTGTAAATGAGAACATCATGGGCTTTTGTGAAGCTC
 AspSerLysPheGluLysGlnLeuGlyGlnValMetLeuLeuValLeuCysAlaValGlnLeuLeuMetArgThrSerTrpAlaPheCysGluAla>

 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500
 TAACCTAGCCACAGGACCAATRAACAACACTCTGGGAAGGATCACCTGGGAAGTCTGGAAACACCCAGATAGCTGTTCCATGGCGAACATCTTTAGAGG
 LeuThrLeuAlaThrGlyProIleThrThrLeuTrpGluGlySerProGlyLysPheTrpAsnThrThrIleAlaValSerMetAlaAsnIlePheArgGly>

 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600
 GAGCTATTTAGCAGGAGCTGGCTGCTTTTCTATCATGAATCAGTTGGNACAGGAAAGAGAGGACAGGGTCACAGGTGAAACCTTGGGAGAAAAG
 SerTyrLeuAlaGlyAlaGlyLeuAlaPheSerIleMetLysSerValGlyThrGlyLysArgGlyThrGlySerGlnGlyLeuThrLeuGlyGluLys>

 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700
 TGGAAAAGAAATTTGAATCAATTACCCTGGAAAGAGTTTGACCTTTACAAAGAAATCCGGAACTACTGAAGTGGATGAAACAGAACCCAAAGAGGGTTGA
 TrpLysLysLysLeuAsnGlnLeuProArgLysGluPheAspLeuTyrLysLysSerGlyIleThrGluValAspArgThrGluAlaLysGluGlyLeu>

 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
 AAAGAGGAAATAACACACCATGCCGTGCCAGAGGCAGCCNAACTCAATGGTTCGTGGAGAGAAACATGGTCAATCCCGAAGGAGAGTCAATAGA
 LysArgGlyGluIleThrHisIleAlaValSerArgGlySerAlaLysLeuGlnTrpPheValGluArgAsnMetValIleProGluGlyArgValIleAsp>

 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900
 CTTAGGCTGTGGAAGAGGAGGCTGGTCAATATTTATGTGCAGGACTGAAAAAAGTTACAGAGTCCGAGGATACACAAAAGCGGCCAGACATGAAGAA
 LeuGlyCysGlyArgGlyGlyTrpSerTyrCysAlaGlyLeuLysLysValThrGluValArgGlyTyrThrLysGlyGlyProGlyHisGluGlu>

 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000
 CCAGTACCTATGTACATACCGATGGAACATAGTCAAGTTAATGAGTGGAAAGGATGTTTATCTCCACCTGAAAGTGTGATACTCTATTGTGTG
 ProValProMetSerThrTyrGlyTrpAsnIleValLysLeuMetSerGlyLysAspValPheTyrLeuProProGluLysCysAspThrLeuLeuLysCys>

8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100
 ACATTGGAGAATCTTCACCAAGCCCAACAGTGGGAAGAAAGCAGAAACCATAAGAGTCTTGAAGATGGTTGAACCATGGCTAAAAAATAACCAAGTTTTCAT
 AspIleGlyGluSerSerProSerProThrValGluGluSerArgThrIleArgValLeuLysMetValGluProTrpLeuLysAsnAsnGlnPheCysIle>

 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200
 TAAAGTATTGAACCCCTTACATGCCAACCTGTGATTGAGCACCTAGAACACTACAAAGAAACATGGAGGAATGCTTGTGAGAAATCCACTCTCACGAAAC
 LysValLeuAsnProTyrMetProThrValIleGluHisLeuGluArgLeuGlnArgLysHisGlyGlyMetLeuValArgAsnProLeuSerArgAsn>

 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300
 TCCACGCACGAAATGTACTGGATATCTAATGGCACAGGCCAATACTGTTCTTCAAGTCAACATGGTATCCAGATTGCTACTTAAACAGATTCCACAATGACAC
 SerThrHisGluMetTyrTrpIleSerAsnGlyThrGlyAsnIleValSerSerValAsnMetValSerArgLeuLeuAsnArgPheThrMetThr>

 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
 ATAGGAGACCCACCATAGAGAAAGATGTGGATTTAGGAGCGGGACCCGACATGTCAATGGGAACCAAGAAACCCCAACATGGATGTCATTTGGGAAAG
 HisArgProThrIleGluLysAspValAspLeuGlyAlaGlyThrArgHisValAsnAlaGluProGluThrProAsnMetAspValIleGlyGluArg>

 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500
 AATAAGAAGGATCAAGGAGGAGCATAGTTCAACATGGCACTATGATGATAAAATCCTTATAAAACCGTGGCTTACCATGGATCCCTATGAAGTTAAGGCC
 IleArgArgIleLysGluGluHisSerSerThrTrpHisTyrAspAspGluAsnProTyrLysThrTrpAlaTyrHisGlySerTyrGluValLysAla>

 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600
 ACAGGCTCAGCCTCCTCCATGATAAATGGAGTCGTGAACCTCCTCACGAAACCATGGATGTGGTCCCATGGTGACACAGATGGCAATGACCGGATACAA
 ThrGlySerAlaSerSerMetIleAsnGlyValValLysLeuLeuThrLysProTrpAspValValProMetValThrGlnMetAlaMetThrAspThr>

 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700
 CCCCATTCGGCCAGCAAGGGTTTTTAAGAGAAAGTGGACACCAGGACCCAGACCTATGCCAGGAACAAGAAAGTTATGGAGATCACACCGGAATG
 ThrProPheGlyGlnGlnArgValPheLysGluLysValAspThrArgThrProArgProMetProGlyThrArgLysValMetGluIleThrAlaGluTrp>

 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800
 GCTTTGGAGAACCCTGGGAGGAACAAGACCAGATTATGTACGAGAGAGGAGITTCACAAAAAAGGTTCAGAAACCAACCGCAGCTATGGCGCCGTTTTT
 LeuTrpArgThrLeuGlyArgAsnLysArgProArgLeuCysThrArgGluGluPheThrLysLysValArgThrAsnAlaAlaMetGlyAlaValPhe>

8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900
 ACAGAGGAGAACCAATGGGACAGTGTCTAGAGCTGTGTGGAGGATGAAGAATCTTGGAACCTCTGGACAGAGAACGTGAACCTCCACAAATGGGCAAGT
 ThrGluGluAsnGlnTrpAspSerAlaArgAlaAlaValGluAspGluPheTrpLysLeuValAspArgGluArgGluLeuHisLysLeuGlyLys>

 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
 GTGGAAGCTGCGTTTACAACATGATGGCAAGAGAGAGAAGAACTTGGAGAGTTGGCAAGGAAAAGGAGTAGAGCCATATGGTACATATGGTGGTGGG
 CysGlySerCysValTyrAsnMetMetGlyLysArgGluLysLysLeuGlyGluPheGlyLysAlaLysGlySerArgAlaIleTrpTyrMetTrpLeuGly>

 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100
 AGCCAGATACCTTGGATTTCGAAGCAGCTCGGATTTAAATGAAGACCATTGGTTCTCGCGTGAANAACCTCTTACAGTGGAGTAGAAGGAGAAGGACTGCAC
 AlaArgTyrLeuGluPheGluAlaLeuGlyPheLeuAsnGluAspHisTrpPheSerArgGluAsnSerTyrSerGlyValGluGlyGluGlyLeuHis>

 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200
 AAGCTGGATACATCTTAAGAGACATTTCCAAGATACCCGGAGGAGCTATGTATGCTGATGACACAGCTGGTTGGGACACAAAGATAACAGAAGATGACC
 LysLeuGlyTyrIleLeuArgAspIleSerLysIleProGlyGlyAlaMetTyrAlaAspAspThrAlaGlyTrpAspThrArgIleThrGluAspAsp>

 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300
 TGCACAATGAGGAAAAAATCACACAGCAAAATGGACCTGAACACAGGAGTGTAGCAACGCTATATTCAAGCTCACATACCACAAAACAAGTGTCAAAGT
 LeuHisAsnGluGlyLysIleThrGlnGlnMetAspProGluHisArgGlnLeuAlaAsnAlaIlePheLysLeuThrTyrGlnAsnLysValValLysVal>

 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400
 TCAACGACCAACTCCAAAGGGCAGGTAATGGACATCATATCTAGGAAGACCAAGAGCCAGTGGACAGGTTGGAACTTATGGTCTGAATACATTACCC
 GlnArgProThrProLysGlyThrValMetAspIleIleSerArgLysAspGlnArgGlySerGlyGlnValGlyThrTyrGlyLeuAsnThrPheThr>

 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500
 AACATGGAAGCCCAAGTTAATCAGACAAATGGAAGGAGAGGTGTGTTGCGAAGGCGAGACCTCGAGAACCCTCATCTGTAGAGAAGAAAAGTTACACAAAT
 AsnMetGluAlaGlnLeuIleArgGlnMetGluGlyGluGlyValLeuSerLysAlaAspLeuGluAsnProHisLeuLeuGluLysLysValThrGln>

 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600
 GGTGGAAACAAAAGGAGTGGAGAGGTTAAAAGAAATGGCCATCAGCCGGGATGATTCGTTGGAACCAATGATGACAGGTTCCGCCAATGCCCTGCT
 TrpLeuGluThrLysGlyValGluArgLeuLysArgMetAlaIleSerGlyAspCysValValLysProIleAspAspArgPheAlaAsnAlaLeuLeu>

 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700
 TGCCCTGAATGACATGGGAAAAGTTAGGAAGGACATACCTCAATGGCCATCAAGGGATGGCATGATGGCAACAGGTCCTTTCTGCTCCACCAC
 AlaLeuAsnAspMetGlyLysValArgLysAspIleProGlnTrpGlnProSerLysGlyTrpHisAspTrpGlnGlnValProPheCysSerHisHis>

10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700
 ACAGCATATTGACGGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATCCAGGCACAGAACCCAGAAAATGGAAATGGTCTGTTGAATCAAC
 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800
 AGGTTCTGGTACCGGTAGGCATCGTGGTGTACGGCTCGTGGTTGGTATGGCTTCAATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGCGGAGTTACATGATCCCC
 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900
 CATGTTGGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTGTGTCAGAAAGTAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCAT
 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000
 AATTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGTGAGTACTCAACCAAGTCAATTCGAGAATAGTGTATGCGGCACCGAGTTGCT
 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100
 CTTGCCCGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGAT
 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200
 CTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCCTCGTGCACCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300
 GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGCGCACCGGAAATGTTGAAFACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAATGAAGCATTATCATCAGGGTT
 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400
 ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAAATGATTTAGAAAATAAACAATAAGGGGTTCCGGGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCCTGACGCTTAAGA
 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500
 AACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGNATTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCT
 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600
 TTAATCGGTAGTTTATCACAGTTTAAATGCTAACCGAGTCAAGCACCGGTGTGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCTCGGCACCGTCAACCCTG
 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700
 GATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGCCCTCTTGGGGATATCGTCCATTCGGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGGTGCTGCTGG
 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800
 CGCTATATGCGGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCGCCAGTCTCGCTCGCTTCCGCTACTTTGGAGC

11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900
 CACTATCGACTACGGATCAIGGCGACACACCCTCTGTGGATCCTACGCCGGACGCATCGTCCCGGCATCACCGGCCACAGGTGGGGTTGCT

 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000
 GCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGAAGATGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCCGTGG

 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100
 CCGGGGACTGTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCAATCTTGGCGGCGGGTGTCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTTAATGCAGGA

 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200
 GTCGGATYAGGGAGAGCGTCCGACCGATGCCCTTGAAGACCTTCAACCCAGTCAGTCTCTCCGGTGGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATG

 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300
 ACTGTCTTCTTTATCATGCAACTGGTAGGACAGGTGCGCGCAGGGCTCTGGGTCAATTTTCGGGAGGACCGCTTTCGGTGGAGCGGACGATCGGCC

 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400
 TGTCCGTTGGGGTATTCCGGAATCTTGACCGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAACGTTTTCCGGGAGAACGAGGCCAATATCGCCGG

 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500
 CATGGCGCGGACGGGCTGGGCTACGTCTTGTGGGTTCCGGACGGAGGCTGGATGGCCTTCCCAATATGATTTCTTCGCTTCCGGGGCATCGGG

 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600
 ATGCCCGGTTGCAGGCCATGTCTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCCGGCTCTTACCAGCCTAAC TTCGATCA

 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700
 CTGGACCGCTGATCGTCAACGGGATTTATGCCGCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCGCCCTATACCCTTGTCTGCCCTCCC

 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800
 CCGGTTGGCTGGGTTGCATGGAGCCGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGCACCTCGCTAACGGATTCCACTCCAAAGATTGGAGCCCAATC

 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900
 AATTCITGGGAGAACTGTGATGGGCAAA CCAACCCCTTGGCAGAACATATCCATCGGCTCCGCCCATCTCCAGCAGCCGCACGGCGGCATCTCGGGCAG

12910 12920 12930 12940 12950 12960 12970 12980 12990 13000
 CGTTGGTCCCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGTCTCCTGCTGGTTGAGGACCCGGCTAGGGCTGGCGGGTTGCTTACTGGTTAGCAGAAATGAAATCACCG
 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090 13100
 ATACCGGAGCGAAGGTGAAGCGGACTGCTGTGCAAAACGCTGTGGACCTGAGCAACAATGAAATGGTCTTCCGTTTCCGTTGTTCCGTAAGTCTGGAAA
 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200
 CGGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATATATGTTCCGGATCTGCATCGCAGATGCTGTGGCTACCCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGGCGCTG
 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300
 GCATTGACCCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACACCGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCAICAGTA
 13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400
 ACCGGTATCGTAGCATCTCTCTCGTTTCAATCGGTATCATATACCCCAAGACAGAAATCCCCCTTACCGGAGGCATCAGTACCAAAACAGGAAAAA
 13410 13420 13430 13440 13450 13460 13470 13480 13490 13500
 CCGCCCTTAAACATGGCCGCTTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGGGATGAAACAGGCAGACATCTGTGAATC
 13510 13520 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600
 GCTTACGACACCGCTGATGACTTTACCGCAGCTGCCCTCGCGGTTTCGGTGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680 13690 13700
 GCTTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGGTGTTGGGGTGTTCGGGGCGGAGCCATGACCCAGTACCGTAGCG
 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800
 ATAGCGGAGTGATACCTGGCTTAACTATGCCGCATCAGAGCAGATTGTACTAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAATACCCGCACAGATGCCGTAAGGGA
 13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900
 AAATACCGCATCAGGCGCTCTTCGGCTTCTCGCTACTGACTCGCTCGGTCGGTTCGGTTCGGTTCGGGCGGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAA
 13910 13920 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000
 TACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGACAGGAAGAACAATGTGAGCAAAAGCCAGCAAAAGCCAGGAACCGTAAAGCCCGGTTGCTGGCGTT
 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080 14090 14100
 TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGGTTTCCC

14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200
 CCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCCTGTTCCGACCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCCGCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCCTCATAGCT

 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300
 CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTTACGCCGACGGCTGCGCCTTATCCGGTAA

 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400
 CTATCGTCTTGAGTCCAAACCCGGTAAACACGACTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTGTCTACA

 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500
 GAGTCTTGAAGTGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAAGAGTTGGTA

 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600
 GCTCTTGATCCGGCAACAACACCCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTTCGAAGCAGCAGATTACGGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTT

 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700
 GATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGATTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCCTTTTA

 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800
 AATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCT

 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900
 GTCTATTTCTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCG

 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000
 AGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCTCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAG

 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100
 TCTATTAATTTGTTGCCGGGAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGACGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTGCCATTGGCTGCAAGATCTGGCTAGCGATGACCCCT

 15110 15120 15130 15140 15150
 GCTGATGGTTCCGTGACCAATTTCCGGGGCCCGGATTTAGGTGACACTATAG

APÉNDICE 3

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la región quimérica CME de DEN1 (Puerto Rico/94)

Bases 1 a 88 (BgIII): DEN4

Bases 89 (BgIII) a 2348 (XhoI): DEN1

Bases 2349 (XhoI) a 2426: DEN4

Bases 102 a 443: ORF de la proteína C

Bases 444 a 941: ORF de la proteína prM

Bases 942 a 2426: ORF de la proteína E

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AGTTGTTAGTCTGTGGACCGACAAGGACAGTTCCAAATCGAAGCTTGCTTAACACAGTTCTAACAGTTTGTGTTGAANTAGAGAGCAGATCTCTGGAAA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGGTCGACCGGCTTTTCAATATGCTGAAACCGCGGAGAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGAAGAGATTC
MetAsnAsnGlnArgLysLysThrGlyArgProSerPheAsnMetLeuLysArgAlaArgAsnArgValSerThrGlySerGlnLeuAlaLysArgPhe>

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TCAAAGGATTGCTTTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTTGGTGATGGCTTTCATAGCATTTCTAAGATTTCTAGCCATACCCCAACAGCAGGAATTTTGG
SerLysGlyLeuLeuSerGlyGlnGlyProMetLysLeuValMetAlaPheIleAlaPheLeuArgPheLeuAlaIleProProThrAlaGlyIleLeu>

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CTAGATGGAGCTCATTCAGAAGAATGGAGCGGATCAAAGTGTACCGGGTTTCAAAAAAGAGATCTCAAGCATGTTGAACATTATGAACACAGGAGGAAAAA
AlaArgTrpSerSerPheLysLysAsnGlyAlaIleLysValLeuArgGlyPheLysLysGluIleSerSerMetLeuAsnIleMetAsnArgArgLysLys>

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
ATCTGTGACCATGCTCCTCATGCTGTCGCCACAGCCCTGGCGTTCCATTTGACCACACGAGGGGAGAGCCACACATGATAGTTAGTAAGCAGGAAAGA
SerValThrMetLeuLeuMetLeuLeuProThrAlaLeuAlaPheHisLeuThrThrArgGlyGlyGluProHisMetIleValSerLysGlnGluArg>
    
```

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
GGAAAGTCACACTGTTGTTAAGACCTTCGACAGGCATCAATATGTGCACCTCTCAATGCGATGGATTTGGAGAGATTATGGAGGACACAAATGACCTACAAAT
GlyLysSerLeuLeuPheLysThrSerAlaGlyIleAsnMetCysThrLeuIleAlaMetAspLeuGlyGluLeuCysGluAspThrMetThrTyrLys>

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
GCCCCGGATCACTGAGCGGACACAGATGACGTTGACTGCTGGTGTCAATGCCACACACATGGGTGACCTATGGGACGTTCTCAAACCGGCGAACA
CysProArgIleThrGluAlaGluProAspAspValAspCysTrpCysAsnAlaThrAspThrTrpValThrTyrGlyThrCysSerGlnThrGlyGluHis>

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
CCGACGAGACAAACGTTCCGTTGGCCTGGCCACACCGTGGACTTACCGGTGACAGCCCTTTTTTAGCACATGCCATGGATGCTCTGAAGGTCCCTGGAAACAA
ArgArgAspLysArgSerValAlaLeuAlaProHisValGlyLeuGlyLeuGluThrArgThrGluThrTrpMetSerSerGluGlyAlaAlaTrpLysGln>

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
GTACAAAAAGTGGAGACTTGGGCTTTGAGACACCCAGGATTCACGGTGACAGCCCTTTTTTAGCACATGCCATGGACATCCATTTACTCAGAAAGGGA
ValGlnLysValIleLeuLeuMetLeuValThrAlaLeuArgHisProGlyPheThrValThrAlaLeuPheLeuAlaHisAlaIleGlyThrSerIleThrGlnLysGly>

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
TCATTTTCATTCGTGATGCTAGTAACACCAATCAATGGCCATGCGATGTGGGAATAGSCAACAGACACTTCGTTGAAGGACTGTCCAGGACACCGTG
IleIlePheIleLeuLeuMetLeuValThrProSerMetAlaMetArgCysValGlyIleGlyAsnArgAspPheValIleGlyLeuSerGlyAlaAlaThrTrp>

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
GGTGGACGTGTTGGAGCATGGAGCTGGCTCACCCATGGCAAAGATAAACCAACATGGACATTTGAACCTTTGAAGACGGAGGTCACAAACCCCT
ValAspValValLeuGluHisGlySerCysValThrThrMetAlaLysAspLysProThrLeuAspIleGluLeuLeuLysThrGluValThrAsnPro>

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
GCCGTCFTGGCCHAACTGTGCATTGAACTAAAATATCAAAACCCACCCGATTCAGGTTCACACACAAAGAGGCTACACTGTGTGGAGAACAAGG
AlaValLeuArgLysLeuCysIleGluAlaLysIleSerAsnThrThrThrAspSerArgCysProThrGlnGlyGluAlaThrLeuValGluGln>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
ACTCGAACTTTGTGTGACGAAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGGGACTATTTGGAAAAGGAGGCTACTGACCGTGTCTAAGTTCAA
AspSerAsnPheValCysArgArgThrPheValAspArgGlyTrpGlyAsnGlyCysGlyLeuPheGlyLysGlySerLeuLeuThrCysAlaLysPheLys>

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
GTGTGTGACAAAACCTAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTTAAATATTCAGTATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCCAGCAGGTGGGAAC
CysValThrLysLeuGluGlyLysIleValGlnTyrGluAsnLeuLysTyrSerValIleValThrValHisThrGlyAspGlnHisGlnValGlyAsn>

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GAGACTACAGAACATGGAAACAATTGGCAACCATTAACACCTCAAGCTCCTAGCTGGGAATAACAGCTGACTACGGAGCCCTACATTGGACTGCTCGC
 GluThrThrGluHisGlyThrIleAlaThrIleThrProGlnAlaProThrSerGluIleGlnLeuThrAspTyrGlyAlaLeuThrLeuAspCysSer>

 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 CTAGAACAGGGCTGGACTTAAATGAGATGGTTCTATTGACAAATGAAGAANAATCATGGCTTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCACCTGCCTTG
 ProArgThrGlyLeuAspPheAsnGluMetValLeuLeuThrMetLysGluLysSerTrpLeuValHisLysGlnTrpPheLeuAspLeuProLeuProTrp>

 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 GACTTCAGGAGCTTCAACATCTCAAGAGACTTGGAACAGACAAGATTGCTGCTCACAATTCAAGACAGCTCATGCAAGAACAACAGGAAGTAGTCGTACTG
 ThrSerGlyAlaSerThrSerGlnGluThrTrpAsnArgGlnAspLeuLeuValThrPheLysThrAlaHisAlaLysLysGlnGluValValValLeu>

 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GGATCACAGGAAGGAGCAATGCACACTGCGTTGACTGGGCGACAGAAATCCAGACGTCAGGAAGCACAACAATCTTTCAGGACACCTGAAATGCAGAC
 GlySerGlnGluGlyAlaMetHisThrAlaLeuThrGlyAlaThrGluIleGlnThrSerGlyThrThrIlePheAlaGlyHisLeuLysCysArg>

 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 TAAAAATGGATAAAGTAACTGACTTTTAAAGGGATGTCATATGTAATGTGCACAGGCTCATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAAGTGT
 LeuLysMetAspLysLeuThrLeuLysGlyMetSerTyrValMetCysThrGlySerPheLysLeuGluLysGluValAlaGluThrGlnHisGlyThrVal>

 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 TTTAGTGCAGGTTAAATACGAAGAACAGATGCGCCCAAGCAAGATCCCTTTTTCGGCCCAAGATGAGAAAGGAGTGCACCCAGAAATGGGAGATTGATAACA
 LeuValGlnValLysTyrGluGlyThrAspAlaProCysLysIleProPheSerAlaGlnAspGluLysGlyValThrGlnAsnGlyArgLeuIleThr>

 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GCCAACCCCTAGTCACTGACAAAGAAAACCAGTCAACATTTGAGACAGAACCCACTTTTGGTGGAGCTACATCGTGGTAGGGCCAGGTGAAAAAAGCTT
 AlaAsnProIleValThrAspLysGluLysProValAsnIleGluThrGluProPheGlyGluSerTyrIleValValGlyAlaGlyGluLysAla>

 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TGAACAGCTGAGCTGGTTCAAGAAAGGGAGCAGCATAGGAAAATGTTGGAAGCAACTGCCGAGGAGCGCGAAGGATGGCTATCCTGGGAGACACCCGATG
 LeuLysLeuSerTrpPheLysLysGlySerSerIleGlyLysMetPheGluAlaThrAlaArgGlyAlaArgMetAlaIleLeuGlyAspThrAlaTrp>

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 GGACTTTGGCTCTATAGGAGGAGTGTTCACATCAGTCAGTGGGAAAATTGGTACACCCAGGTTTTTGGAGCCGCATATGGGGTTCTGTTCAGCGGTGTTCTTGG
 AspPheGlySerIleGlyGlyValPheThrSerValGlyLysLeuValHisGlnValPheGlyAlaAlaTyrGlyValLeuPheSerGlyValSerTrp>

 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 ACCATGAAAATAGGAATAGGGAATCTGCTGACATGGCTAGGATTAARACTCGAGGAACACTTCAATGGCTATGACGTGCATAGCTGTTGGAGGAATCACTC
 ThrMethLysIleGlyIleGlyIleLeuLeuThrTrpLeuGlyLeuAsnSerArgAsnThrSerMetAlaMetThrCysIleAlaValGlyGlyIleThr>

 2410 2420
 TGTTCGGGCTTCACAGTTCAGCA
 LeuPheLeuGlyPheThrValGlnAla>

APÉNDICE 4

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la región quimérica ME de DEN1 (Puerto Rico/94)

Bases 1 a 404 (PstI): DEN4

Bases 405 (PstI) a 2345 (XhoI): DEN1

Bases 2346 (XhoI) a 2423: DEN4

Bases 102 a 440: ORF de la proteína C

Bases 441 a 938: ORF de la proteína prM

Bases 939 a 2423: ORF de la proteína E

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AGTTGTTAGTCTGTGTGGACCGCACAGGACAGTCCAAATCGGAAGCTTGCTTAACACAGTTCTAACAAGTTTGTGAATAGAGAGCAGATCTCTGGAAA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AATGAACCAACGAAAAAGGTGGTTAGACCACCTTTCAATATGCTGAACCGGAGAGAACCCGGTATCAACCCCTCAAGGTTGGTGAAGAGATTCTCA
MetAsnGlnArgLysLysValValArgProPheAsnMetLeuLysArgGluArgAsnArgValSerThrProGlnGlyLeuValLysArgPheSer>

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ACCGGACTTTTTCTGGAAAGGACCCTTACGGATGGTGTAGCATTCATCACGTTTTTGGAGTCCITTCATCCACCAACAGCAGGATTTCTGAAGA
ThrGlyLeuPheSerGlyLysGlyProLeuArgMetValLeuAlaPheIleThrPheLeuArgValLeuSerIleProProThrAlaGlyIleLeuLys>

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
GATGGGACAGTTGAAGAAAAAATAGGCCATCAAGATACTGATTGGATTTCAGGAGGAGATAGCCGGCATGCTGAACATCTTGAACGGGAGAAAAGGTC
ArgTrpGlyGlnLeuLysLysAsnLysAlaIleLysIleLeuIleGlyPheArgLysGluIleGlyArgMetLeuAsnIleLeuAsnGlyArgLysArgSer>

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TGCAGCCATGCTCCTCATGTGTGCCACAGCCCTGGGGTTCCATTTGACACACAGGGGGAGAGCCACACATGATAGTAGTACGAGGAAAGAGGA
AlaAlaMetLeuLeuMetLeuLeuProThrAlaLeuAlaPheHisLeuThrThrArgGlyGlyGluProHisMetIleValSerLysGlnGluArgGly>

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
AAGTCACTGTTGTTAAGACCTCTGCAGGCATCAATATGTGGCACTCTCATTCGGATGGATTGGGAGAGTTATGGGAGGACACAATGACCTACAAATGCC
LysSerLeuLeuPheLysThrSerAlaGlyIleAsnMetCysThrLeuIleAlaMetAspLeuGlyGluLeuCysGluAspThrMetThrTyrLysCys>

```

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 CCCGGATCATTGAGCGGAAACCAGATGACGTTGACTGGTGGCAATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGGACCTGTCTTCARACCCGGCGGACACCCG
 ProArgIleThrGluAlaGluProAspAspValAspCysTyrCysAsnAlaThrAspThrTrpValThrTyrGlyThrCysSerGlnThrGlyGluHisArg>

 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 ACGAGCAAAACGTTCCGTGGCAGCTGGCCACACAGTGGACTTTGGTCTAGAAACAAAGAACCCGAAACATGGATGTCTCTAGAGGTGCTGGAACAAAGTA
 ArgAspLysArgSerValAlaAlaLeuAlaProHisValGlyLeuGlyLeuGluThrArgThrGluThrTrpMetSerSerGluGlyAlaAlaTrpLysGlnVal>

 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 CAAAAGTGGAGACTTGGCTTTGGACACCCAGGATTCACGGTGACAGCCCTTTTTTAGCACATGCCATAGGAACATCCATTACTCAGAAAGGGATCA
 GlnLysValGluThrTrpAlaLeuArgHisProGlyPheThrValThrAlaLeuPheLeuAlaHisAlaIleGlyThrSerIleThrGlnLysGlyIle>

 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 TTTTCATTCTGCTGATGTAGTAAACACCATCAATGGCCATGCCATGTGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTACGAGACCAACCTGGGT
 IlePheIleLeuLeuMetLeuValThrProSerMetAlaMetArgCysValGlyIleGlyAsnArgAspPheValGluGlyLeuSerGlyAlaThrTrpVal>

 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 GGACGGGTATTGGAGCATGGAAAGCTGCTCACCCATGGCAAAAGATAAACCAACATTGGACATTTGAACTCTTGAAGCGGAGGTCACAAACCCCTGCC
 AspValValLeuGluHisGlySerCysValThrMetAlaLysAspLysProThrLeuAspIleGluLeuLeuLysThrGluValThrAsnProAla>

 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTCTTGGCAAACTGTGCATTTGAAGCTAAATATCAAAACACCACCCAGGATTCAGGTTCCAAACACAAAGGAGGCTACACTGGTGGAAAGAACAGGACT
 ValLeuArgLysLeuCysIleGluAlaLysIleSerAsnThrThrThrAspSerArgCysProThrGlnGlyGluAlaThrLeuValGluGlnValAsp>

 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 CGAACTTTGTGTGTCGACGAAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGGGACTATTTGGAAAAGGAAAGCTACTGACGTGTCTAAGTTCAAGTG
 SerAsnPheValCysArgArgThrPheValAspArgGlyTrpGlyAsnGlyCysGlyLeuPheGlyLysGlySerLeuLeuThrCysAlaLysPheLysCys>

 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TGTGACAAAACCTAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTTAAAATATTCAGTGATAGTCACTCCACACTGGGACCAGCACCCAGGTGGGAAACCGAG
 ValThrLysLeuGluGlyLysIleValGlnTyrGlnAsnLeuLysTyrSerValIleValThrValHisThrGlyAspGlnHisGlnValGlyAsnGlu>

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 ACTCAGAACATGGAAACAATTGGCAACCATACACCTCAAGCTCTAGCTGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCCCTCACATTGGACTGCTGCCTA
 ThrThrGluHisGlyThrIleAlaThrIleThrProGlnAlaProThrSerGluIleGlnLeuThrAspTyrGlyAlaLeuThrLeuAspCysSerPro>
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 GAACAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTTCTATTGACAATGAAGAAATCAATGGCTTGCCACAACAATGGTTCTAGACTTACCACCTGCCCTGGAC
 ArgThrGlyLeuAspPheAsnGluMetValLeuLeuThrMetLysGluLysSerTrpLeuValHisLysGlnTrpPheLeuAspLeuProLeuProTrpThr>
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 TTCAGGAGCTTCAACATCTCAGAGACTTGGACACAGACAGATTTGCTGTCTCATTCAAGACACCTCATGTGAAAGAAACAGGAAGTAGTCGTACTGGGA
 SerGlyAlaSerThrSerGlnGluThrTrpAsnArgGlnAspLeuLeuValThrPheLysThrAlaHisAlaLysLysGlnGluValValLeuGly>
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TCACAGGAAGGCAATGCACACTGCTGGTGTGACTGGGGCCACAGAAATCCAGAGCTCAGGACACCAACAATTTTCAGGACACCTGAAATGCAGACTAA
 SerGlnGluGlyAlaMetHisThrAlaLeuThrGlyAlaThrGluIleGlnThrSerGlyThrThrIlePheAlaGlyHisLeuLysCysArgLeu>
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 AAATGGATAACTGACTTTAAAGGGATGTCATATGTAATGTGCACAGGCTCATTTAAGCTPAGAGAAAGAGTGACCAGAAATGGGAGATTGATAACAGCC
 LysMetAspLysLeuThrLeuLysGlyMetSerTyrValMetCysThrGlySerPheLysLeuGluLysGluValAlaGluThrGlnHisGlyThrValLeu>
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 AGTCAGGTTAATACGAAAGAACAGATGCCCATGCAAGATCCCTTTTCGGCCCAAGATGAGAAGAGAGTGACCAGAAATGGGAGATTGATAACAGCC
 ValGlnValLysTyrGluGlyThrAspAlaProCysLysIleProPheSerAlaGlnAspGluLysGlyValThrGlnAsnGlyArgLeuIleThrAla>
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 AACCCATAGTCACACAAAGAAACCCAGTCAACATTGAGACAGAACCCCTTTTGTGTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCCAGGTGAAAAGCTTTGA
 AsnProIleValThrAspLysGluLysProValAsnIleGluThrGluProPheGlyGluSerTyrIleValValGlyAlaGlyLysAlaLeu>
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 AACTGAGCTGTTCAAGAAAGGAGCAGCATAGGAAATGTTGAAAGCACTGCCCGAGGAGCGGAGGATGGCTATCCTGGGAGACACCCGCAATGGGA
 LysLeuSerTrpPheLysLysGlySerSerIleGlyLysMetPheGluAlaThrAlaArgGlyAlaArgArgMetAlaIleLeuGlyAspThrAlaTrpAsp>
 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 CTTTGGCTCTATAGGAGGAGTTCACATCAGTGGGAAATGGTACACCCAGGTTTTTGGAGCCGATATGGGGTTCTGTTTCAGCGGTGTTCTTGGACC
 PheGlySerIleGlyGlyValPheThrSerValGlyLysLeuValHisGlnValPheGlyAlaAlaTyrGlyValLeuPheSerGlyValSerTrpThr>

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 ATGAAAATAGGAATAGGGATTCTGCTGACATGGCTAGGATTAAACTCGAGGAACACTTCAATGGCTATGACCGTCATAGCTGTTGGAGGAATCACTCTGT
 MetLysIleGlyIleGlyIleLeuLeuThrTyrLeuGlyLeuAsnSerArgAsnThrSerMetAlaMetThrCysIleAlaValGlyGlyIleThrLeu>

2410 2420
 TTCTGGGCTTCACAGTTCRAAGCA
 PheLeuGlyPheThrValGlnAla

Aunque la presente invención se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y comprensión, un experto en la técnica apreciará que pueden hacerse diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del alcance verdadero de la invención. Todas las figuras, tablas, apéndices, patentes, publicaciones y solicitudes de patente, a los que se hace referencia anteriormente, se incorporan al presente documento por referencia.

- 5 También se desvelan los siguientes puntos:
- 10 1. Una composición inmunogénica que es tetravalente y que contiene una delección común de 30 nucleótidos en la región no traducida de 3' en los tipos 1, 2, 3 y 4 de dengue y que comprende un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica al menos una proteína estructural de un primer virus dengue y una segunda secuencia que codifica proteínas no estructurales de un segundo virus dengue, en donde el segundo virus del dengue está atenuado mediante una delección de aproximadamente 30 nucleótidos de la región no traducida de 3' del genoma del dengue que corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2.
 - 15 2. La composición del punto 1, en donde el ácido nucleico comprende adicionalmente una mutación que genera un mutante que tiene un fenotipo en donde el fenotipo es sensible a temperatura en células *Vero* o en la línea celular de hígado humano HuH-7, restricción del hospedador celular en células de mosquito o en la línea celular de hígado humano, adaptación de la célula hospedadora para una replicación mejorada en células *Vero* o atenuación en ratones o monos.
 - 20 3. La composición del punto 1 o 2, en donde el serotipo del primer virus del dengue es el mismo que el serotipo del segundo virus del dengue.
 - 25 4. La composición del punto 3, en donde el serotipo es tipo 1.
 5. La composición del punto 4, en donde la delección es una delección de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 1 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10562-10591.
 - 30 6. La composición del punto 3, en donde el serotipo es de tipo 2.
 7. La composición del punto 6, en donde la delección es una delección de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 2 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10541-10570.
 - 35 8. La composición del punto 3, en donde el serotipo es de tipo 3.
 9. La composición del punto 8, en donde la delección es una delección de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 3 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10535-10565.
 - 40 10. La composición del punto 3, en donde el serotipo es de tipo 4.
 - 45 11. La composición del punto 6, en donde la delección es una delección de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 4 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10478-10507.
 - 50 12. La composición del punto 1 o 2, en donde el serotipo del primer virus del dengue es diferente del serotipo del segundo virus del dengue y en donde el ácido nucleico es una quimera de ácido nucleico.
 - 55 13. La composición del punto 12, en donde el serotipo del segundo virus del dengue que tiene la delección es de tipo 1.
 14. La composición del punto 13, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 2.
 15. La composición del punto 13, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 3.
 16. La composición del punto 13, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 4.
 - 60 17. La composición de cualquiera de los puntos 13-16, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica al menos dos proteínas estructurales del primer virus del dengue.
 18. La composición del punto 17, en donde las proteínas estructurales son proteínas prM y E.
 - 65 19. La composición de cualquiera de los puntos 13-18, en donde la delección es una delección de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 1 que se corresponde con la

estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10562 y 10591.

20. La composición del punto 12, en donde el serotipo del segundo virus del dengue que tiene la deleción es de tipo 2.
- 5 21. La composición del punto 20, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 1.
22. La composición del punto 20, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 3.
- 10 23. La composición del punto 20, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 4.
24. La composición de cualquiera de los puntos 20-23, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica al menos dos proteínas estructurales del primer virus del dengue.
- 15 25. La composición del punto 24, en donde las proteínas estructurales son proteínas prM y E.
26. La composición de cualquiera de los puntos 20-25, en donde la deleción es una deleción de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 2 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10541 y 10570.
- 20 27. La composición del punto 12, en donde el serotipo del segundo virus del dengue que tiene la deleción es de tipo 3.
28. La composición del punto 27, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 1.
- 25 29. La composición del punto 27, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 2.
30. La composición del punto 27, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 4.
- 30 31. La composición de cualquiera de los puntos 27-30, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica al menos dos proteínas estructurales del primer virus del dengue.
32. La composición del punto 31, en donde las proteínas estructurales son proteínas prM y E.
- 35 33. La composición de cualquiera de los puntos 27-32, en donde la deleción es una deleción de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 3 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10535 y 10565.
- 40 34. La composición del punto 12, en donde el serotipo del segundo virus del dengue que tiene la deleción es de tipo 4.
35. La composición del punto 34, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 1.
- 45 36. La composición del punto 34, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 2.
37. La composición del punto 34, en donde el serotipo del primer virus del dengue es de tipo 3.
- 50 38. La composición de cualquiera de los puntos 34-37, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica al menos dos proteínas estructurales del primer virus del dengue.
39. La composición del punto 38, en donde las proteínas estructurales son proteínas prM y E.
40. La composición de cualquiera de los puntos 34-39, en donde la deleción es una deleción de aproximadamente 30 nucleótidos desde la región no traducida de 3' del genoma del dengue de tipo 4 que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre aproximadamente los nucleótidos 10478 y 10507.
- 55 41. La composición de cualquiera de los puntos 1-40 en donde el uno o más ácido nucleico o quimera de ácido nucleico comprende un virus o una quimera de virus.
- 60 42. La composición de cualquiera de los puntos 1-41 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.
43. Un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición de cualquiera de los puntos 1-41 al sujeto.
- 65 44. El método del punto 43, en donde el sujeto es un ser humano.

45. Una vacuna tetravalente que comprende la composición de cualquiera de los puntos 1-41.
46. La vacuna del punto 45 para su uso en la prevención de la enfermedad causada por el virus del dengue.
- 5 47. Un método de prevención de la enfermedad causada por el virus del dengue en un sujeto que comprende la administración de una cantidad eficaz de la vacuna del punto 45 al sujeto.
48. El método del punto 47, en donde el sujeto es un ser humano.
- 10 49. Una sonda o cebador de ácido nucleico aislado que hibrida de manera selectiva con y posee al menos cinco nucleótidos complementarios con el ácido nucleico o la hebra complementaria del ácido nucleico que codifica el sitio de escisión que separa la proteína de la cápside y la proteína premembrana de la quimera de ácido nucleico que comprende la composición del punto 18, 25, 32 o 39.
- 15 50. Una composición que opcionalmente comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en sensibilidad a temperatura en células *Vero* o en la línea celular de hígado humano HuH-7, restricción de la célula hospedadora en células de mosquito o en la línea celular de hígado humano HuH-7, adaptación de la célula hospedadora para una replicación mejorada en células *Vero*, o atenuación en ratones o monos, comprendiendo la composición un miembro seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 (1) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (2) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- 25 (3) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (4) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 30 (5) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (6) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- 35 (7) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (8) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 40 (9) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (10) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- 45 (11) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (12) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 50 (13) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (14) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (15) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- 55 (16) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (17) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- 60 (18) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (19) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (20) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 65 (21) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (22) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (23) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,

- (24) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (25) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
- 5 (26) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (27) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (28) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
- 10 (29) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (30) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (31) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
- 15 (32) rDEN1 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (33) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
- 20 (34) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (35) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (36) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
- 25 (37) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (38) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
- 30 (39) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (40) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (41) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
- 35 (42) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (43) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
- 40 (44) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (45) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (46) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
- 45 (47) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (48) rDEN1 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
- 50 (49) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (50) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (51) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
- 55 (52) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (53) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
- 60 (54) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (55) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (56) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
- 65 (57) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4 Δ 30,

- (58) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 5 (59) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (60) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (61) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 10 (62) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (63) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (64) rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 15 (65) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (66) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 20 (67) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (68) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (69) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 25 (70) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (71) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 30 (72) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (73) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (74) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 35 (75) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (76) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 40 (77) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (78) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (79) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 45 (80) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (81) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 50 (82) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 (83) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (84) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 55 (85) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 (86) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,
 60 (87) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/2 Δ 30,
 (88) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30,
 (89) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4 Δ 30,
 65 (90) rDEN1/2 Δ 30, rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, rDEN4/1 Δ 30,

- (91) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (92) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 5 (93) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (94) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 10 (95) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (96) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (97) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 15 (98) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (99) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 20 (100) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (101) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (102) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 25 (103) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (104) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 30 (105) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (106) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (107) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 35 (108) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (109) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 40 (110) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (111) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (112) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 45 (113) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (114) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 50 (115) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (116) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (117) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 55 (118) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (119) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 60 (120) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (121) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (122) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 65 (123) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,

- (124) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 5 (125) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (126) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (127) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- 10 (128) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (129) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- 15 (130) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (131) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (132) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 20 (133) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (134) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (135) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- 25 (136) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (137) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- 30 (138) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (139) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (140) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 35 (141) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (142) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- 40 (143) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (144) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (145) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- 45 (146) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (147) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- 50 (148) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (149) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- 55 (150) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (151) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (152) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- 60 (153) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (154) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (155) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- 65 (156) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,

- (157) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (158) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 5 (159) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (160) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 10 (161) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (162) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (163) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 15 (164) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (165) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 20 (166) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (167) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (168) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 25 (169) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (170) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 30 (171) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (172) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (173) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 35 (174) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (175) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 40 (176) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (177) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (178) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 45 (179) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (180) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 50 (181) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (182) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (183) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 55 (184) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (185) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 60 (186) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (187) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (188) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 65 (189) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,

- (190) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (191) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 5 (192) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (193) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 10 (194) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (195) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (196) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 15 (197) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (198) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 20 (199) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (200) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (201) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 25 (202) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (203) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 30 (204) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (205) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (206) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 35 (207) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (208) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 40 (209) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (210) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (211) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 45 (212) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (213) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 50 (214) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (215) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (216) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 55 (217) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (218) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 60 (219) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (220) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (221) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 65 (222) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,

- (223) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (224) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 5 (225) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (226) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 10 (227) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (228) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (229) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 15 (230) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (231) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 20 (232) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (233) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (234) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 25 (235) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (236) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 30 (237) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (238) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (239) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 35 (240) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (241) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 40 (242) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (243) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (244) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 45 (245) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (246) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 50 (247) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (248) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (249) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 55 (250) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (251) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 60 (252) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (253) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (254) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 65 (255) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, y

(256) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Health and Human Services

10 <120> VACUNA TETRAVALENTE DEL DENGUE QUE CONTIENE UNA DELECIÓN COMÚN DE 30 NUCLEÓTIDOS EN LA 3'-UTR DE LOS TIPOS 1, 2, 3 Y 4 DEL DENGUE O DE LOS VIRUS DEL DENGUE ANTIGÉNICOS QUIMÉRICOS 1, 2, 3 Y 4

<130> K2825 EP/1 S3

15 <150> US 60/377.860
<151> 03-05-2002

<150> US 60/436.500
<151> 23-12-2002

20 <160> 53

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1
<211> 82
<212> ARN
<213> Virus del dengue 1

30 <400> 1

```

gcagcagcgg ggcccaadac caggggaagc uguaccucgg ugguaaggac uagagguuag 60
aggagacccc ccgcaacaac aa 82

```

<210> 2
<211> 84
<212> ARN
<213> Virus del dengue 2

40 <400> 2

```

agcaacaaug ggggcccag gugagaugaa gcuguagucu cacuggaagg acuagagguu 60
agaggagacc ccccaaaaac aaaa 84

```

<210> 3
<211> 83
<212> ARN
<213> Virus del dengue 3

50 <400> 3

```

gcagcagcgg ggcccagcgc cugaggggaag cuguaccucc uugcaaagga cuagagguua 60
gaggagaccc cccgcaaaa aa 83

```

<210> 4
<211> 83
<212> ARN
<213> Virus del dengue 4

60 <400> 4

```

agcaaaaagg ggcccgaagc caggaggaag cuguaccucc uggggaagga cuagagguua 60
gaggagaccc ccccaacaca aa 83

```

ES 2 677 348 T3

5 <210> 5
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dengue 1 delta 30

10 <400> 5
 ggggcccaag acuaga 16

15 <210> 6
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dengue 2 delta 30

20 <400> 6
 ggggcccaag acuaga 16

25 <210> 7
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dengue 3 delta 30

30 <400> 7
 ggggcccaag acuaga 16

35 <210> 8
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dengue 4 delta 30

40 <400> 8
 ggggcccaag acuaga 16

45 <210> 9
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región TL2 del plásmido p2

50 <400> 9
 tggggccca aggtgagatg aagctgtagt ctactggaa ggactagagg t 51

55 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Región TL2 de p2 delta 30
 <400> 10
 tggggccca agactagagg t 21

ES 2 677 348 T3

5 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Región TL2 del plásmido p3

 10 <400> 11
 cggggcccca gctctgaggg aagctgtacc tccttgcaaa ggactagagg t 51

 15 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Región TL2 de p3 delta 30

 20 <400> 12
 gggggcccaa gactagaggt 20

 25 <210> 13
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador Spe1 en p3

 30 <400> 13
 actagttaga ctaactaag tcaactagt 29

 35 <210> 14
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Unión 1 de rDEN2/4

 <400> 14
 cagtttggtt gaatagagag cagatctctg atgaataacc aacgaaaaa g 51

 45 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Unión 1 de rDBN2/4

 <400> 15

 55 Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys
 1 5

 60 <210> 16
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 677 348 T3

<220>
 <223> Unión 2 de rDBN2/4

<400> 16
 5 attatcacat g gataggaat gaactcgagg aacactcaa tggctatgac g 51

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Unión 2 de rDEN2/4

15 <400> 17

 Ile Ile Thr Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met
 1 5 10 15
 Thr

<210> 18
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Unión 3 de rDEN2/4

25 <400> 18

 atcttgaacg ggagaaaaag gctgcaggc atgatcatta tgcgtattcc a 51

30 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Unión 3 de rDEN2/4

<400> 19

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

40 <210> 20
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Unión 1 de rDEN3/4

50 <400> 20

 cagtttgitt gaatagagag cagatctctg gaaaaatgaa caaccaacgg 50

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Unión 1 de rDEN3/4

60

ES 2 677 348 T3

<400> 21

Met Asn Asn Gln Arg
1 5

5 <210> 22
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Unión 2 de rDEN3/4

<400> 22
cttttaacct ggatagggtt gaactcgagg aacactcaa tggctatgac g 51

15 <210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Unión 2 de rDBN3/4

25 <400> 23
Leu Leu Thr Trp Ile Gly Leu Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met
1 5 10 15
Thr

30 <210> 24
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Unión 3 de rDEN3/4

<400> 24
atctgaacg ggagaaaaag gtctgcagtc tgtctcatga tgaigtacc a 51

40 <210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Unión 3 de rDENT3/4

<400> 25
Ile Leu Asn Gly Arg Lys Arg Ser Ala Val Cys Leu Met Met Met Leu
1 5 10 15
Pro

50 <210> 26
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Unión 1 de rDEN1/4

ES 2 677 348 T3

<400> 26
cagtttgitt gaatagagag cagatctctg gaaaaatgaa caaccaacgg 50

5 <210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Unión 1 de rDEN1/4

<400> 27

Met Asn Asn Gln Arg
1 5

15

<210> 28
<211> 51
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Unión 2 de rDEN1/4

25 <400> 28
ctgctgacat ggctaggatt aaactcgagg aacactcaa tggctatgac g 51

30 <210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Unión 2 de rDEN1/4

<400> 29

Leu Leu Thr Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met
1 5 10 15
Thr

40 <210> 30
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Unión 3 de rDEN1/4

<400> 30
atcttgaacg ggagaaaaag gctgcagcc atgctcctca tgcctgctgcc c 51

50

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Unión 3 de rDEN1/4

60 <400> 31

ES 2 677 348 T3

```

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

<210> 32
<211> 60
5 <212> ARN
   <213> Virus del dengue 4

<400> 32
10 ccaacaaccu ugacagcauc cuuagucaug cuuuuagucc auuaugcaau aauaggcca 60

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
15 <213> Virus del dengue 4

   <400> 33

    Pro Thr Thr Leu Thr Ala Ser Leu Val Met Leu Leu Val His Thr Ala
    1           5           10           15
    Ile Ile Gly Pro
    20

<210> 34
<211> 60
20 <212> ARN
   <213> Virus del dengue 1

<400> 34
25 ccgcugacgc ugacagcggc gguauuuuug cuaguggcuc auuaugccau aauaggacc 60

<210> 35
<211> 20
30 <212> PRT
   <213> Virus del dengue 1

   <400> 35

    Pro Leu Thr Leu Thr Ala Ala Val Pro Met Leu Val Ala His Thr Ala
    1           5           10           15
    Ile Ile Gly Pro
35 20

<210> 36
<211> 60
40 <212> ARN
   <213> Virus del dengue 2

<400> 36
ccuauaacc ucacagcggc ucuucuuuuu uugguagcac auuaugccau cauaggaccg 60

<210> 37
<211> 20
45 <212> PRT
   <213> Virus del dengue 2

50 <400> 37

```

ES 2 677 348 T3

Pro Ile Thr Leu Thr Ala Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala His Thr Ala
 1 5 10 15
 Ile Ile Gly Pro
 20

5 <210> 38
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Virus del dengue 3

10 <400> 38
 ccacuaaacuc ucacagcggc aguucuccug cuagucacgc auuauagcuau uauaggucca 60

15 <210> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue 3

<400> 39

Pro Leu Thr Leu Thr Ala Ala Val Leu Leu Leu Val Thr His Thr Ala
 1 5 10 15
 Ile Ile Gly Pro
 20

20 <210> 40
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 40
 ccacgggcgcg cgt 13

30 <210> 41
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 41
 aaggcctgga 10

45 <210> 42
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

50 <400> 42
 tatcccggg ac 12

55 <210> 43
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 677 348 T3

<223> Cebador

<400> 43
agagctctct c 11

5

<210> 44
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador

<400> 44
gaatctccac cggga 15

15

<210> 45
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Cebador

25

<400> 45
ctgtcgaatc 10

<210> 46
<211> 15159
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Plásmido p2 del dengue 2

35

<400> 46

agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattccttg agggagctaa gctcaacgta 60
 gttcetaactg ttttttgatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120
 agaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcaac tgtacaacag 180
 ttgacaaaaga gattctcact tggaaatgctg cagggacgag gaccactaaa attgttcatg 240
 gccctgggtgg cattccttctg tttcctaaca atcccaccaa cagcagggat attaaaaaga 300
 tggggaacaa ttaaaaaatc aaaggctatt aatgttctga gaggcttcag gaaagagatt 360
 ggaaggatgc tgaatatctt aaacaggaga cgtagaactg taggcatgat catcatgctg 420
 actccaacag tgatggcggt tcatctgacc acacgcaacg gagaaccaca catgattgtc 480
 agtagacaag aaaaaggga aagccttctg ttcaagacaa aggatggcac gaacatgtgt 540
 accctcatgg ccatggacct tggtaggtg tgtgaagaca caatcacgta taaatgtcct 600
 tttctcaagc agaacgaacc agaagacata gattgttggg gcaactccac gtccacatgg 660
 gtaacttatg ggacatgtac caccacagga gagcacagaa gagaaaaaag atcagtggcg 720
 cttgttccac acgtgggaat gggattggag acacgaaactg aaacatggat gtcacagaa 780
 ggggcctgga aacatgccca gagaattgaa acttggattc tgagacatcc aggccttacc 840
 ataattggcg caatcctggc atacaccata gggacgacgc atttccaaag agtccctgata 900
 ttcacctac tgacagccat cgctccttca atgacaatgc gctgcatagg aatatcaaat 960
 agggactttg tggaaaggagt gtcaggaggg agttgggttg acatagtttt agaacatgga 1020
 agttgtgtga cgaagatggc aaaaaacaaa ccaacactgg actttgaact gataaaaaaca 1080
 gaagccaaac aacctgccac cttaagggaag tactgtatag aggccaaact gaccaacacg 1140
 acaacagact cgcgctgccc aacacaaggg gaacccaccc tgaatgaaga gcaggacaaa 1200
 aggtttgtct gcaaacattc catggtagac agaggatggg gaaatggatg tggattgttt 1260
 ggaaaaggag gcatcgtgac ctgtgctatg ttcacatgca aaaagaacat ggaaggaaaa 1320
 attgtgcagc cagaaaaact ggaatacact gtcgtgataa cacctcattc aggggaagaa 1380
 catgcagtgg gaaatgacac aggaaaaacat ggtaaagaag tcaagataac accacagagc 1440
 tccatcacag aggcggaact gacaggctat ggcactgtta cgatggagtg ctctccaaga 1500
 acgggcctcg acttcaatga gatggtgttg ctgcaaactg aagacaaagc ctggctgggtg 1560
 cacagacaat ggttcctaga cctaccgttg ccatggctgc cgggagcaga cacacaagga 1620
 tcaaatggga tacagaaaga aacactggtc accttcaaaa atcccctatg gaaaaaacag 1680
 gatgttgttg tcttaggac ccaagagggg gccatgcata cagcactcac aggggctacg 1740
 gaaatccaga tgtcatcagg aaacctgctg ttcacaggac atctcaagtg caggctgaga 1800
 atggacaaat tacaacttaa agggatgtca tactccatgt gcacaggaaa gtttaaaatt 1860
 gtgaaggaaa tagcagaaac acaacatgga acaatagtca ttagagtaca atatgaagga 1920
 gacggctctc catgcaagat ccccttgag ataatggatc tggaaaaaag acatgttttg 1980
 ggccgcctga tcacagtcaa cccaattgta acagaaaagg acagtccagt caacatagaa 2040
 gcagaacctc cattcggaga cagctacatc atcataggag tggaaaccagg acaattgaag 2100
 ctggactggt tcaagaaagg aagtccatc ggccaaatgt ttgagacaac aatgagggga 2160
 gcgaaaagaa tggccatttt gggtagacaca gcctgggatt ttggatctct gggaggagtg 2220
 ttcacatcaa taggaaaggc tctccaccag gtttttggag caatctacgg ggctgctttc 2280
 agtggggtct catggactat gaagatcctc ataggagtta tcatcacatg gataggaatg 2340
 aactcacgta gcactagtct gagcgtgtca ctggtgttag tgggaatcgt gacactttac 2400
 ttgggagtta tggtagcagg cgatagtggc tgcgttgtga gctggaagaa caaagaacta 2460
 aaatgtggca gtggaatatt cgtcacagat aacgtgcata catggacaga acaatacaag 2520
 tccaaccag aatccccttc aaaactggcc tcagccatcc agaaagcgca tgaagagggc 2580
 atctgtggaa tccgctcagt aacaagactg gaaaatctta tgtggaaaca gataacatca 2640
 gaattgaatc atattctatc agaaaatgaa gtgaaactga ccatcatgac aggagacatc 2700
 aaaggaatca tgcaggtagg aaaacgatct ttgocgctc aacctactga gttgaggat 2760
 tcatggaaaa catggggtaa agcgaaaatg ctctccacag aactccacaa tcagaccttc 2820
 ctcattgatg gtcccgaaac agcagaatgc cccaacacaa acagagcttg gaattcactg 2880
 gaagttgagg actacggctt tggagtattc actaccaata tatggctaag attgagagaa 2940
 aagcaggatg tattttgtga ctcaaaactc atgtcagcgg ccataaagga caacagagcc 3000
 gtccatgctg atatgggtta ttggatagaa agcgcactca atgatacatg gaagatagag 3060
 aaagcttctt tcattgaagt caaaagtgc cactggccaa agtcacacac cctatggagt 3120
 aatggagtgc tagaaagcga gatggtcatt ccaaagaatt tcgctggacc agtgtcacia 3180
 cataataaca gaccaggcta ttacacacaa acagcaggac cttggcatct aggcaagctt 3240

gagatggact ttgattttctg cgaagggact acagtggtgg t'aa'c'og'aga'a' dtgtggaaac 3300
agagggccct ctttaagaac aaocactgoc tcaggaaaac tcataacgga atgggtgttg 3360
cgatcttgca cactaccacc actaagatac agaggtgagg atggatgttg gtaocgggatg 3420
gaaatcagac cattgaaaga gaaagaagaa aatctgggca gttctctggt tacagccgga 3480
catgggcaga ttgacaattt ctcattagga atcttgggaa tggcactggt cottgaagaa 3540
atgctcagga ctogagtagg aacaaaacat gcaatattac togtocgagt ttctttcgtg 3600
acgctaatac cagggaaacat gtcttttaga gacctgggaa gagtgatggt tatgggtgggt 3660
gccaccatga cagatgacat aggcattgggt gtgacttato togtctact agcagctttt 3720
agagtcagac caacctttgc agctggactg ctcttgagaa aactgacctc caaggaatta 3780
atgatgacta ccataggaat cgtttctctc tcccagagta gcataccaga gaccattctt 3840
gaaactgacc acgcgttagc totagggcatg atggctctca agatgggtgag aaacatggaa 3900
aaatatcagc tggcagtgac catcatggct attttgtgcg tcccaaagtc tgtgatatta 3960
cagaacgcac ggaaagtgag ttgcacaata ttggcagtggt tgtctgttct cccctgctc 4020
ttaacatcct cacaaacagaa agcggactgg ataccattag cgttgaogac caaaggctct 4080
aatccaacag ccatttttct aacaacctc tcaagaacca acaagaaaag gagctggcct 4140
ttaaatgagg ccattcatggc ggttgggatg gtgagtatct tggccagctc tctcttaaag 4200
aatgacatcc ccattgacagg accattagtg gctggagggc tcttactgt gtgctacgtg 4260
ctaactgggc ggtcagccga tctggaatta gagagagcta ccgatgtcaa atgggatgac 4320
caggcagaga taccaggtag cagtccaatc ctgtcaataa caatatcaga agatggcagc 4380
atgtcaataa agaatgaaga ggaagagcaa acaactgacta tactcattag aacaggattg 4440
cttgtgatct caggactctt tccggtatca ataccaatta cagcagcagc atggtatctg 4500
tgggaagtaa agaaacaacg ggtcggagtg ctgtgggatg tccctcacc accaccctg 4560
ggaaaagctg aattggaaga tggagcctac agaatcaagc aaaaaggaat ccttggatat 4620
tcccagatcg gagctggagt ttacaaagaa ggaacatttc acacaatgtg gcaogtcaac 4680
cgtggcgctg toctaattgca taaggggaag aggattgaac catcatgggc ggaogtcaag 4740
aaagacttaa tatcatatgg aggaggttgg aagctagaag gagaatggaa agaaggagaa 4800
gaagtccagg tcttggcatt ggagccaggg aaaaatccaa gagccgtcca aacaaagcct 4860
ggccttttta gaaccaacac tggaaacata ggtgcogtat ctctggactt ttccctggg 4920
acgtcaggat ctccaatcgt cgacaaaaaa ggaaaagtg taggtctota tggcaatgg 4980
gtcgttaca gtagtggagc atatgtgagt gccatagctc agactgaaaa aagcaattgaa 5040
gacatccag agattgaaga tgacatctt cgaagagaa gattgactat atggatctc 5100
caccaggag caggaaagac aaagagatac ctcccgcca tagtcagaga ggccataaaa 5160
agaggttga gaacactaat cctagcccc actagagctc tggcagctga aatggaggaa 5220
gcccttagag gacttccaat aagataccaa actccagcta tcagggtgaa gcaocccgg 5280
cgggagattg tagacttaat gtgtcatgoc acatttacca tgaggctgct atcaccatc 5340
aggggtgccc attacaacct gatcatcatg gacgaagccc attttacaga tccagcaagc 5400
atagcagcta ggggatacat ctcaactcga gtggagatgg gggaggcagc tggaaatctt 5460
atgacagcca ctctccggg tagtagagat ccatttctc agagcaatgc accaattatg 5520
gacgaagaaa gagaaattcc ggaacgttca tggaaactctg ggcacgagtg ggtcacggat 5580
tttaaaggaa agactgtctg gtttgttcca agcataaaaa ccggaaatga catagcagc 5640
tgctgagaa agaattggaa gaggtgata caactcagta ggaagacct tgattotgaa 5700
tatgtcaaga ctagaaccaa tgactgggat tctgtggtta caactgacat ctoggaaatg 5760
gggcaccaact ttaaagctga gaggtcata gaccccagac gdtgcatgaa accagttata 5820
ttgacagaag gogaagagcg ggtgattctg gcaggaccca tggcagtgac ccaactctagt 5880
gcagcacaac gaagaggag aataggaagg aatccaagga atgaaaatga tcaatatata 5940
tatatggggg aocactgga aatgatgaa gactgtgccc actggaagga agctaagatg 6000
ctcctagata atatcaaac acctgaagga atcattccca gcttgttoga gccagagcgt 6060
gaaaaggtgg atgccattga cggtgaaat cgtttgagag gagaagcac gaaaactttt 6120
gtggacctaa tgagaagagg agacctacca gtctggttgg ctataaaagt ggcagctgaa 6180
ggtatcaact acgcagacag aagatggtgt tttgacggaa ccagaaacaa tcaaatcttg 6240
gaagaaaatg tggaaagtga aatctggaca aaggaagggg aaaggaaaaa attgaaacct 6300
agatggttag atgotaggat ctactccgac ccactggcgc taaaagagtt caaggaatct 6360
gcagccggaa gaaagtccct aacctgaac ctaattacag agatgggcag actcccaact 6420
tttatgactc agaaggccag agatgcaacta gacaacttgg cggtgctgca cacggctgaa 6480
gcgggtggaa aggcatacaa tcatgctctc agtgaattac cggagacctt ggagacattg 6540

cttttgctga cactggttggc cacagtcacg ggaggaatct tcttattcct gatgagcggg 6600
 aggggtatgg ggaagatgac cctgggaatg tgctgcataa tcacggccag catcctctta 6660
 tggatgacac aaatacagcc acattggata gcagcctcaa taatattgga gttctttctc 6720
 atagtcttgc tcattccaga accagaaaag cagaggacac ctcaggataa tcaattgact 6780
 tatgtcatca tagccatcct cacagtggtg gccgcaacca tggcaaacga aatgggtttt 6840
 ctggaaaaaa caaagaaaga cctcggactg ggaaacattg caactcagca acctgagagc 6900
 aacattctgg acatagatct acgtcctgca tcagcatgga cgttgatgac cgtggctaca 6960
 acatttatca caccaatggt gagacatagc attgaaaatt cctcagtaaa tgtgtcccta 7020
 acagccatag ctaaccaagc cacagtgcta atgggtctcg gaaaaggatg gccattgtca 7080
 aagatggaca ttggagttcc cctccttget attgggtggt actcacaagt caacctata 7140
 acctcacadg cggctcttct tttattggta gcacattatg ccatcatagg accgggactt 7200
 caagccaaaag caactagaga agctcagaaa agagcagcag cgggcatcat gaaaaacca 7260
 actgtggatg gaataacagt gatagatcta gatccaatac cctatgatcc aaagtttgaa 7320
 aagcagttgg gacaagtaat gctcctagtc ctctgogtga cccaagtgtc gatgatgagg 7380
 actacgtggg ctttgtgtga agccttaact ctagcaactg gaccctgttc cacattgtgg 7440
 gaaggaaatc cagggagatt ctggaacaca accattgcag tgtcaatggc aaacatcttt 7500
 agagggagtt acctggctgg agctggactt ctcttttcta tcatgaagaa cacaaccagc 7560
 acgagaagag gaactggcaa tataggagaa acgttaggag agaaatggaa aagcagactg 7620
 aacgcattgg ggaagagtga attccagatc tacaacaaaa gtggaattca agaagtggac 7680
 agaaccttag caaaagaagg cattaacaga ggagaaacgg atcatcaagc tgtgtcgcga 7740
 ggctcagcaa aactgagatg gttcgttgaa aggaatttgg tcacaccaga agggaaagta 7800
 gtggaccttg gttgtggcag agggggctgg tcatactatt gtggaggatt aaagaatgta 7860
 agagaagtta aaggcttaac aaaaggagga ccaggacacg aagaacctat cctatgtca 7920
 acatatgggt ggaatctagt acgcttacag agcggagttg atgttttttt tgttccacca 7980
 gagaagtgtg acacattggt gtgtgacata ggggaatcat caccaaatcc caoggtagaa 8040
 gcgggacgaa cactcagagt cctcaaccta gtggaatatt ggotgaacaa taacacccaa 8100
 ttttgcgtaa aggttcttaa cccgtacatg cctcagtc a tgaaagaat ggaacctta 8160
 caacggaaat acggaggagc cttggtgaga aatccactct caoggaatc cacacatgag 8220
 atgtactggg tgtccaatgc ttccgggaac atagtgtcat cagtgaacat gatttcaaga 8280
 atgotgatca acagattcac tatgagacac aagaaggcca cctatgagcc agatgtcgac 8340
 ctgggaagng gaacccgcaa tattggaatt gaaagtgaga caccgaacct agacataatt 8400
 gggaaaagaa tagaaaaaat aaaacaagag catgaaacgt catggcacta tgatcaagac 8460
 caccatatac aaacatgggc ttaccatggc agctatgaaa caaacagac tggatcagca 8520
 tcctccatgg tgaacggagt agtcagattg ctgacaaaac cctgggacgt tgttccaatg 8580
 gtgacacaga tggcaatgac agacacaact ctttttggac aacagcoggt cttcaaagag 8640
 aaggtggata cgagaaccca agaaccacaaa gaaggoacaa aaaaactaat gaaaatcag 8700
 gcagagtggc totggaaaga actaggaaag aaaaagacac ctagaatgtg taccagagaa 8760
 gaattcacia aaaaggtgag aagcaatgca gccttggggg ccatattcac ogatgagaac 8820
 aagtggaaat cggcogctga agccgttgaa gatagtgggt ttggggagct ggttgacaag 8880
 gaaaggaacc tccatcttga agggaaatgt gaaacatgtg tatacaacat gatggggaaa 8940
 agagagaaaa aactaggaga gtttggtaaa gcaaaaggca gcagagccat atggtacatg 9000
 tggctcggag caogcttctt agagtittgaa gccctaggat ttttgaatga agaccattgg 9060
 ttctccagag agaactcctt gagtggagtg gaaggagaag ggotgcataa gctaggttac 9120
 atcttaagag aggtgagcaa gaaagaagga ggagcaatgt atgocgatga caccgcaggc 9180
 tgggacacaa gaatcacaat agaggatttg aaaaatgaag aaatgataac gaaccacatg 9240
 gcaggagaac acaagaaact tgccgaggcc atttttaaat tgacgtacca aaacaaggtg 9300
 gtgogtgtgc aaagaccaac accaagaggc acagtaatgg acatcatatc gagaagagac 9360
 caaaggggta gtggacaagt tggcacctat ggctcaaca ctttcacaa catggaagca 9420
 caactaatta ggcaaatgga gggggaagga atcttcaaaa gcatccagca cttgacagcc 9480
 tcagaagaaa tegtgtgca agattggcta gtaagagtag ggcgtgaaag gttgtcaaga 9540
 atggccatca gtggagatga ttgtgtgtg aaacctttag atgatagatt tgaagagct 9600
 ctaacagctc taatgacat gggaaaggtt aggaaggaca tacagcaatg ggagccctca 9660
 agaggatgga acgactggac gcaggtgccc ttctgttcac accattttca cgagttaatt 9720
 atgaaagatg gtcgcacact cgtagtcca tgcaaaaacc aagatgaatt gatcggcaga 9780
 gccogaatth ccaggggagc tgggtggtct ttacgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840

tacgccccaa tgtggagcct gatgtacttc cacagacgtg atcttcaggct agcggcdaat 9900
gccatctgct cggcagtcoc atcacactgg attccaacaa gccggacaac ctgggtccata 9960
cacgcccagcc atgaatggat gacgaocggaa gacatggtga cagtttggaa cagagtgtgg 10020
atcctagaaa atccatggat ggaagacaaa actccagtgga aatcatggga ggaaatocca 10080
taoctgggaa aaagagaaga ccaatggtgc ggctcgtcga ttgggctgac aagcagagcc 10140
acctgggcca agaatatcca gacagcaata aaccaagtca gatccctcat tggcaatgag 10200
gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaggcagga 10260
gttttgtggt agaaaaacat gaaacaaaac agaagtcagg tcggattaag ccatagtacg 10320
ggaaaaacta tgctacctgt gagccccgtc caaggacgtt aaaagaagtc aggccatttt 10380
gatgccatag cttgagcaaa ctgtgcagcc tgtagctcca cctgagaagg tgtaaaaaat 10440
ccgggaggcc acaaacccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc ggttagagga 10500
gacccctccc ttacagatcg cagcaacaat gggggcccaa ggtgagatga agctgtagtc 10560
tcaactggaag gactagagggt tagaggagac cccccaaaa caaaaaacag cataattgacg 10620
ctgggaaaga ccagagatcc tgcctgtctcc tcagcatcat tccaggcaca ggacgcccaga 10680
aaatggaatg gtgctggtga atcaacagggt tctggtaacc gtaggcacgc tgggtctacg 10740
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 10800
atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggc cctccgatcg ttgtcagaag 10860
taagttggcc gcagtggtat cactcatggt tatgtcagca ctgcataatt ctctactgt 10920
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tnaaccaagt cattctgaga 10980
atagtgatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca acacgggata ataccgccc 11040
acatgcccaga accttaaaag tgctcatcat tggaaaaagc tcttcggggc gaaaactctc 11100
aaggatctta ccgctggtga gatccagttc gatgtaacc actcgtgac ccaactgatc 11160
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 11220
cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atggtgaata ctcatactct tcccttttca 11280
atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgat 11340
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 11400
ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgatca cgaggccctt 11460
tcgtcttcaa gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga taagctttaa tgcggtagtt 11520
tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagg caccgtgat gaaatctaac aatgcgctca 11580
tcgtcatcct cggcaccgtc accctggatg ctgtaggcac aggcctgggtt atgccggtac 11640
tgccgggctt cttgcccgat atcgtccatt ccgacagcat cgcagtcac tatggcgtgc 11700
tgctggcgtt atatgcttg atgcaatttc tatgcccacc cgttctcggg gcaactgtccg 11760
accgctttgg ccgcccacca gtccctgctcg ctccgctact tggagccact atcgactacg 11820
cgatcatggc gaccacaccc gtccctgtgga tccctctacgc cggacgcacg gtggccggca 11880
tcacccggcg cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag 11940
atccggctcg ccaactccgg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc 12000
ccgtggccgg gggactgtty ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg 12060
tgctcaacgg cctcaacctc ctactgggct gcttctaact gcaggagtcg cataagggag 12120
agcgtcgacc gatgccctty agagccttoa acccagtcag ctccctccgg tgggcgcggg 12180
gcactgactat cgtcgcgcga cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg 12240
tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga 12300
tcggcctgtc gcttgccgta ttccggaatct tgcacgccct cgctcaagcc ttcgtcactg 12360
gtcccgccac caaacgtttc ggcgagaagc aggcattat cgcggcatg gcggccgacg 12420
cgctgggcta cgtcttctg gcttccgca ccgagggctg gatggccttc ccattatga 12480
ttctctctgc ttccggcggc atccggatyc ccgcttgca ggccatgctg tccaggcagg 12540
tagatgacga ccatcagggc cagcttcaag gatcgtctgc ggctcttacc agcctaactt 12600
cgatcactgg accgctgatc gtcacggcga tttatgccc ctccggcagc acatggaacg 12660
ggttggcatg gattgtaggc gcgcacctat acctgtctg cctcccgcg ttgctcgcg 12720
gtgcatggag ccgggcccacc tcgacctgaa tgggaagccg cggcacctcg ctaacggatt 12780
caccactcca agaattggag ccaatcaatt cttgoggaga actgtgaatg cgcaaaccaa 12840
cccttggcag aacatatcca tcgctccgc catctccagc agccgcacgc ggccgatctc 12900
gggcagcgtt gggctcctggc cccgggtgcg catgatcgtg ctccctgctg tgaggaccocg 12960
gctaggctgg cggggttgcc ttactggtta gcagaatgaa tcaccgatac gcgagcgaac 13020
gtgaagcgac tgctgctgca aaacgtctgc gacctgagca acaacatgaa tggctctcgg 13080
tttccgtggt tcgtaaaagtc tggaaacgcg gaagtcagcg cctgcacca ttatgctccg 13140

```

gatctgcatc gcaggatgct gctggctaacc ctgtggaaca cctacatctg tattaacgaa 13200
gcgctggcat tgaccctgag tgattttttct ctgggtccgc cgcattccata ccgccagttg 13260
tttaccctca caacgttcca gtaaacgggc atgttccatca tcagtaaccc gtatcgtgag 13320
catcctctct cgtttcatcg gtatcattac ccccatgaac agaaatcccc cttacacgga 13380
ggcatcagtg accaaacagg aaaaaaccgc cottaacatg gcccgcttta tcagaagcca 13440
gacattaacg cttctggaga aactcaacga gotggacgcg gatgaacagg cagacatctg 13500
tgaatcgctt cacgaccacg ctgatgagct ttaccgcagc tgectcgcg gtttcgggtga 13560
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 13620
ggatgceggg agcagacaag cccgtcaggg ccgctcagcg ggtggtggcg ggtgtcgggg 13680
cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgat actggcttaa ctatgcggca 13740
tcagagcaga ttgtaactgag agtgcaccat atgccgtgtg aaataccgca cagatgcgta 13800
aggagaaaat accgcattcag gcgctcttcc gcttctctcg tcaactgactc gctgcgctcg 13860
gtcgttcggc tgccggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 13920
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa gccaggaac 13980
cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 14040
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg 14100
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac 14160
ctgtccgctt ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 14220
ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgctcag 14280
cccgaccgct gcgccttctc cggtaactat cgtcttgagt ocaaccgggt aagacacgac 14340
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcgg 14400
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 14460
atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 14520
aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 14580
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 14640
gaaaactcac gttaagggat tttggctcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 14700
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaataca atctaaagta tatabgagta aacttggctc 14760
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 14820
tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 14880
ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 14940
ataaaccagc cagccgggag ggcgcgagcg agaagtggtc ctgcaacttt atccgctcc 15000
atccagctca ttaattggtg ccgggaagct agagtaagta gttcggcagt taatagtttg 15060
cgcaacgttg ttgccattgc tgcaagatct ggctagcgat gaccctgctg attggttcgc 15120
tgaccatttc cgggcgcgcc gatttaggtg acactatag 15159

```

<210> 47
 <211> 3391
 5 <212> PRT
 <213> Virus del dengue 2 (Tonga/74)

<400> 47

```

Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys Ala Arg Asn Thr Pro Phe Asn Met Leu
 1                    5                    10                    15
Lys Arg Glu Arg Asn Arg Val Ser Thr Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg
                20                    25                    30
Phe Ser Leu Gly Met Leu Gln Gly Arg Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met
                35                    40                    45
Ala Leu Val Ala Phe Leu Arg Phe Leu Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly
                50                    55                    60
Ile Leu Lys Arg Trp Gly Thr Ile Lys Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val
65                    70                    75                    80
Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn
                85                    90                    95

```

10

ES 2 677 348 T3

Arg Arg Arg Arg Thr Val Gly Met Ile Ile Met Leu Thr Pro Thr Val
 100 105 110
 Met Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val
 115 120 125
 Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Lys Asp Gly
 130 135 140
 Thr Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu
 145 150 155 160
 Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Phe Leu Lys Gln Asn Glu Pro Glu
 165 170 175
 Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly
 180 185 190
 Thr Cys Thr Thr Thr Gly Glu His Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala
 195 200 205
 Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp
 210 215 220
 Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Ala Gln Arg Ile Glu Thr Trp
 225 230 235 240
 Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Ile Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr
 245 250 255
 Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Val Leu Ile Phe Ile Leu Leu
 260 265 270
 Thr Ala Ile Ala Pro Ser Met Thr Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn
 275 280 285
 Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val
 290 295 300
 Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr
 305 310 315 320
 Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu
 325 330 335
 Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr Asn Thr Thr Thr Asp Ser
 340 345 350
 Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Thr Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys
 355 360 365
 Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly
 370 375 380
 Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Thr
 385 390 395 400
 Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Ile Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu
 405 410 415
 Tyr Thr Val Val Ile Thr Pro His Ser Gly Glu Glu Glu His Ala Val Gly
 420 425 430
 Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Val Lys Ile Thr Pro Gln Ser
 435 440 445
 Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu
 450 455 460
 Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln
 465 470 475 480
 Met Glu Asp Lys Ala Trp Leu Val His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu
 485 490 495
 Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile
 500 505 510
 Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln
 515 520 525
 Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu

ES 2 677 348 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
| Thr | Gly | Ala | Thr | Glu | Ile | Gln | Met | Ser | Ser | Gly | Asn | Leu | Leu | Phe | Thr |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| Gly | His | Leu | Lys | Cys | Arg | Leu | Arg | Met | Asp | Lys | Leu | Gln | Leu | Lys | Gly |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | | 575 |
| Met | Ser | Tyr | Ser | Met | Cys | Thr | Gly | Lys | Phe | Lys | Ile | Val | Lys | Glu | Ile |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| Ala | Glu | Thr | Gln | His | Gly | Thr | Ile | Val | Ile | Arg | Val | Gln | Tyr | Glu | Gly |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| Asp | Gly | Ser | Pro | Cys | Lys | Ile | Pro | Phe | Glu | Ile | Met | Asp | Leu | Glu | Lys |
| 610 | | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | |
| Arg | His | Val | Leu | Gly | Arg | Leu | Ile | Thr | Val | Asn | Pro | Ile | Val | Thr | Glu |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| Lys | Asp | Ser | Pro | Val | Asn | Ile | Glu | Ala | Glu | Pro | Pro | Phe | Gly | Asp | Ser |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| Tyr | Ile | Ile | Ile | Gly | Val | Glu | Pro | Gly | Gln | Leu | Lys | Leu | Asp | Trp | Phe |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | |
| Lys | Lys | Gly | Ser | Ser | Ile | Gly | Gln | Met | Phe | Glu | Thr | Thr | Met | Arg | Gly |
| | | 675 | | | | 680 | | | | | | 685 | | | |
| Ala | Lys | Arg | Met | Ala | Ile | Leu | Gly | Asp | Thr | Ala | Trp | Asp | Phe | Gly | Ser |
| 690 | | | | | 695 | | | | | | 700 | | | | |
| Leu | Gly | Gly | Val | Phe | Thr | Ser | Ile | Gly | Lys | Ala | Leu | His | Gln | Val | Phe |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 |
| Gly | Ala | Ile | Tyr | Gly | Ala | Ala | Phe | Ser | Gly | Val | Ser | Trp | Thr | Met | Lys |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | |
| Ile | Leu | Ile | Gly | Val | Ile | Ile | Thr | Trp | Ile | Gly | Met | Asn | Ser | Arg | Ser |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | 750 | | | |
| Thr | Ser | Leu | Ser | Val | Ser | Leu | Val | Leu | Val | Gly | Ile | Val | Thr | Leu | Tyr |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | |
| Leu | Gly | Val | Met | Val | Gln | Ala | Asp | Ser | Gly | Cys | Val | Val | Ser | Trp | Lys |
| 770 | | | | | 775 | | | | | | 780 | | | | |
| Asn | Lys | Glu | Leu | Lys | Cys | Gly | Ser | Gly | Ile | Phe | Val | Thr | Asp | Asn | Val |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 |
| His | Thr | Trp | Thr | Glu | Gln | Tyr | Lys | Phe | Gln | Pro | Glu | Ser | Pro | Ser | Lys |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | |
| Leu | Ala | Ser | Ala | Ile | Gln | Lys | Ala | His | Glu | Glu | Gly | Ile | Cys | Gly | Ile |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | |
| Arg | Ser | Val | Thr | Arg | Leu | Glu | Asn | Leu | Met | Trp | Lys | Gln | Ile | Thr | Ser |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | |
| Glu | Leu | Asn | His | Ile | Leu | Ser | Glu | Asn | Glu | Val | Lys | Leu | Thr | Ile | Met |
| 850 | | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | |
| Thr | Gly | Asp | Ile | Lys | Gly | Ile | Met | Gln | Val | Gly | Lys | Arg | Ser | Leu | Arg |
| 865 | | | | | 870 | | | | | 875 | | | | | 880 |
| Pro | Cln | Pro | Thr | Glu | Leu | Arg | Tyr | Ser | Trp | Lys | Thr | Trp | Gly | Lys | Ala |
| | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | 895 | |
| Lys | Met | Leu | Ser | Thr | Glu | Leu | His | Asn | Gln | Thr | Phe | Leu | Ile | Asp | Gly |
| | | | 900 | | | | | 905 | | | | | 910 | | |
| Pro | Glu | Thr | Ala | Glu | Cys | Pro | Asn | Thr | Asn | Arg | Ala | Trp | Asn | Ser | Leu |
| | | 915 | | | | | 920 | | | | | 925 | | | |
| Glu | Val | Glu | Asp | Tyr | Gly | Phe | Gly | Val | Phe | Thr | Thr | Asn | Ile | Trp | Leu |
| 930 | | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | |
| Arg | Leu | Arg | Glu | Lys | Gln | Asp | Val | Phe | Cys | Asp | Ser | Lys | Leu | Met | Ser |
| 945 | | | | | 950 | | | | | 955 | | | | | 960 |
| Ala | Ala | Ile | Lys | Asp | Asn | Arg | Ala | Val | His | Ala | Asp | Met | Gly | Tyr | Trp |
| | | | | 965 | | | | | 970 | | | | | 975 | |

ES 2 677 348 T3

Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile Glu Lys Ala Ser Phe
 980 985 990
 Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Ser
 995 1000 1005
 Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Val Ile Pro Lys Asn Phe Ala Gly
 1010 1015 1020
 Pro Val Ser Gln His Asn Asn Arg Pro Gly Tyr Thr Gln Thr Ala
 1025 1030 1035 1040
 Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp Phe Asp Phe Cys Glu
 1045 1050 1055
 Gly Thr Thr Val Val Thr Glu Asn Cys Gly Asn Arg Gly Pro Ser
 1060 1065 1070
 Leu Arg Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile Thr Glu Trp Cys Cys
 1075 1080 1085
 Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Cys
 1090 1095 1100
 Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu Lys Glu Glu Asn Leu
 1105 1110 1115 1120
 Val Ser Ser Leu Val Thr Ala Gly His Gly Gln Ile Asp Asn Phe Ser
 1125 1130 1135
 Leu Gly Ile Leu Gly Met Ala Leu Phe Leu Glu Glu Met Leu Arg Thr
 1140 1145 1150
 Arg Val Gly Thr Lys His Ala Ile Leu Leu Val Ala Val Ser Phe Val
 1155 1160 1165
 Thr Leu Ile Thr Gly Asn Met Ser Phe Arg Asp Leu Gly Arg Val Met
 1170 1175 1180
 Val Met Val Gly Ala Thr Met Thr Asp Asp Ile Gly Met Gly Val Thr
 1185 1190 1195 1200
 Tyr Leu Ala Leu Leu Ala Ala Phe Arg Val Arg Pro Thr Phe Ala Ala
 1205 1210 1215
 Gly Leu Leu Leu Arg Lys Leu Thr Ser Lys Glu Leu Met Met Thr Thr
 1220 1225 1230
 Ile Gly Ile Val Leu Leu Ser Gln Ser Ser Ile Pro Glu Thr Ile Leu
 1235 1240 1245
 Glu Leu Thr Asp Ala Leu Ala Leu Gly Met Met Val Leu Lys Met Val
 1250 1255 1260
 Arg Asn Met Glu Lys Tyr Gln Leu Ala Val Thr Ile Met Ala Ile Leu
 1265 1270 1275 1280
 Cys Val Pro Asn Ala Val Ile Leu Gln Asn Ala Trp Lys Val Ser Cys
 1285 1290 1295
 Thr Ile Leu Ala Val Val Ser Val Ser Pro Leu Leu Leu Thr Ser Ser
 1300 1305 1310
 Gln Gln Lys Ala Asp Trp Ile Pro Leu Ala Leu Thr Ile Lys Gly Leu
 1315 1320 1325
 Asn Pro Thr Ala Ile Phe Leu Thr Thr Leu Ser Arg Thr Asn Lys Lys
 1330 1335 1340
 Arg Ser Trp Pro Leu Asn Glu Ala Ile Met Ala Val Gly Met Val Ser
 1345 1350 1355 1360
 Ile Leu Ala Ser Ser Leu Leu Lys Asn Asp Ile Pro Met Thr Gly Pro
 1365 1370 1375
 Leu Val Ala Gly Gly Leu Leu Thr Val Cys Tyr Val Leu Thr Gly Arg
 1380 1385 1390
 Ser Ala Asp Leu Glu Leu Glu Arg Ala Thr Asp Val Lys Trp Asp Asp
 1395 1400 1405
 Gln Ala Glu Ile Ser Gly Ser Ser Pro Ile Leu Ser Ile Thr Ile Ser

ES 2 677 348 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|--|--|-------------------------|-----------------|------|--|-----------------------------|-------------------------|--|--|------|--|--|--|--|------|
| 1410 | | | | | | 1415 | | | | | | 1420 | | | | | |
| Glu Asp Gly Ser Met | | | | | Ser Ile Lys Asn | | | | Glu Glu Glu Gln Thr Leu | | | | | | | | |
| 1425 | | | | | 1430 | | | | 1435 | | | | | | | | 1440 |
| Thr Ile Leu Ile Arg | | | | Thr Gly Leu Leu | | | | Val Ile Ser Gly Leu Phe Pro | | | | | | | | | |
| | | | | 1445 | | | | 1450 | | | | | | | | | 1455 |
| Val Ser Ile Pro Ile Thr | | | | Ala Ala Ala Trp Tyr | | | | Leu Trp Glu Val Lys | | | | | | | | | |
| | | | | 1460 | | | | 1465 | | | | | | | | | 1470 |
| Lys Gln Arg Ala Gly Val | | | | Leu Trp Asp Val Pro Ser | | | | Pro Pro Pro Val | | | | | | | | | |
| | | | | 1475 | | | | 1480 | | | | | | | | | 1485 |
| Gly Lys Ala Glu Leu Glu | | | | Asp Gly Ala Tyr Arg | | | | Ile Lys Gln Lys Gly | | | | | | | | | |
| | | | | 1490 | | | | 1495 | | | | | | | | | 1500 |
| Ile Leu Gly Tyr Ser Gln | | | | Ile Gly Ala Gly Val Tyr | | | | Lys Glu Gly Thr | | | | | | | | | |
| 1505 | | | | 1510 | | | | 1515 | | | | | | | | | 1520 |
| Phe His Thr Met Trp His | | | | Val Thr Arg Gly Ala Val | | | | Leu Met His Lys | | | | | | | | | |
| | | | | 1525 | | | | 1530 | | | | | | | | | 1535 |
| Gly Lys Arg Ile Glu Pro | | | | Ser Trp Ala Asp Val Lys | | | | Lys Lys Asp Leu Ile | | | | | | | | | |
| | | | | 1540 | | | | 1545 | | | | | | | | | 1550 |
| Ser Tyr Gly Gly Gly Trp | | | | Lys Leu Glu Gly Glu Trp | | | | Lys Glu Gly Glu | | | | | | | | | |
| | | | | 1555 | | | | 1560 | | | | | | | | | 1565 |
| Glu Val Gln Val Leu Ala | | | | Leu Glu Pro Gly Lys Asn | | | | Pro Arg Ala Val | | | | | | | | | |
| | | | | 1570 | | | | 1575 | | | | | | | | | 1580 |
| Gln Thr Lys Pro Gly Leu | | | | Phe Arg Thr Asn Thr Gly | | | | Thr Ile Gly Ala | | | | | | | | | |
| 1585 | | | | 1590 | | | | 1595 | | | | | | | | | 1600 |
| Val Ser Leu Asp Phe Ser | | | | Pro Gly Thr Ser Gly Ser | | | | Pro Ile Val Asp | | | | | | | | | |
| | | | | 1605 | | | | 1610 | | | | | | | | | 1615 |
| Lys Lys Gly Lys Val Val | | | | Gly Leu Tyr Gly Asn Gly | | | | Val Val Thr Arg | | | | | | | | | |
| | | | | 1620 | | | | 1625 | | | | | | | | | 1630 |
| Ser Gly Ala Tyr Val Ser | | | | Ala Ile Ala Gln Thr Glu | | | | Lys Ser Ile Glu | | | | | | | | | |
| | | | | 1635 | | | | 1640 | | | | | | | | | 1645 |
| Asp Asn Pro Glu Ile Glu | | | | Asp Asp Ile Phe Arg Lys | | | | Arg Arg Arg Leu Thr | | | | | | | | | |
| | | | | 1650 | | | | 1655 | | | | | | | | | 1660 |
| Ile Met Asp Leu His Pro | | | | Gly Ala Gly Lys Thr Lys | | | | Arg Tyr Leu Pro | | | | | | | | | |
| 1665 | | | | 1670 | | | | 1675 | | | | | | | | | 1680 |
| Ala Ile Val Arg Glu Ala | | | | Ile Lys Arg Gly Leu Arg | | | | Thr Leu Ile Leu | | | | | | | | | |
| | | | | 1685 | | | | 1690 | | | | | | | | | 1695 |
| Ala Pro Thr Arg Val Val | | | | Ala Ala Glu Met Glu Glu | | | | Ala Leu Arg Gly | | | | | | | | | |
| | | | | 1700 | | | | 1705 | | | | | | | | | 1710 |
| Leu Pro Ile Arg Tyr Gln | | | | Thr Pro Ala Ile Arg Ala | | | | Glu His Thr Gly | | | | | | | | | |
| | | | | 1715 | | | | 1720 | | | | | | | | | 1725 |
| Arg Glu Ile Val Asp Leu | | | | Met Cys His Ala Thr Phe | | | | Thr Met Arg Leu | | | | | | | | | |
| | | | | 1730 | | | | 1735 | | | | | | | | | 1740 |
| Leu Ser Pro Ile Arg Val | | | | Pro Asn Tyr Asn Leu Ile | | | | Ile Ile Met Asp Glu | | | | | | | | | |
| 1745 | | | | 1750 | | | | 1755 | | | | | | | | | 1760 |
| Ala His Phe Thr Asp Pro | | | | Ala Ser Ile Ala Ala Arg | | | | Gly Tyr Ile Ser | | | | | | | | | |
| | | | | 1765 | | | | 1770 | | | | | | | | | 1775 |
| Thr Arg Val Glu Met Gly | | | | Glu Ala Ala Gly Ile Phe | | | | Met Thr Ala Thr | | | | | | | | | |
| | | | | 1780 | | | | 1785 | | | | | | | | | 1790 |
| Pro Pro Gly Ser Arg Asp | | | | Pro Phe Pro Gln Ser Asn | | | | Ala Pro Ile Met | | | | | | | | | |
| | | | | 1795 | | | | 1800 | | | | | | | | | 1805 |
| Asp Glu Glu Arg Glu Ile | | | | Pro Glu Arg Ser Trp Asn | | | | Ser Gly His Glu | | | | | | | | | |
| | | | | 1810 | | | | 1815 | | | | | | | | | 1820 |
| Trp Val Thr Asp Phe Lys | | | | Gly Lys Thr Val Trp Phe | | | | Val Pro Ser Ile | | | | | | | | | |
| | | | | 1825 | | | | 1830 | | | | | | | | | 1835 |
| Lys Thr Gly Asn Asp Ile | | | | Ala Ala Cys Leu Arg Lys | | | | Asn Gly Lys Arg | | | | | | | | | |
| | | | | 1845 | | | | 1850 | | | | | | | | | 1855 |

ES 2 677 348 T3

Val Ile Gln Leu Ser Arg Lys Thr Phe Asp Ser Glu Tyr Val Lys Thr
 1860 1865 1870
 Arg Thr Asn Asp Trp Asp Phe Val Thr Thr Asp Ile Ser Glu Met
 1875 1880 1885
 Gly Ala Asn Phe Lys Ala Glu Arg Val Ile Asp Pro Arg Arg Cys Met
 1890 1895 1900
 Lys Pro Val Ile Leu Thr Asp Gly Glu Glu Arg Val Ile Leu Ala Gly
 1905 1910 1915 1920
 Pro Met Pro Val Thr His Ser Ser Ala Ala Gln Arg Arg Gly Arg Ile
 1925 1930 1935
 Gly Arg Asn Pro Arg Asn Glu Asn Asp Gln Tyr Ile Tyr Met Gly Glu
 1940 1945 1950
 Pro Leu Glu Asn Asp Glu Asp Cys Ala His Trp Lys Glu Ala Lys Met
 1955 1960 1965
 Leu Leu Asp Asn Ile Asn Thr Pro Glu Gly Ile Ile Pro Ser Leu Phe
 1970 1975 1980
 Glu Pro Glu Arg Glu Lys Val Asp Ala Ile Asp Gly Glu Tyr Arg Leu
 1985 1990 1995 2000
 Arg Gly Glu Ala Arg Lys Thr Phe Val Asp Leu Met Arg Arg Gly Asp
 2005 2010 2015
 Leu Pro Val Trp Leu Ala Tyr Lys Val Ala Ala Glu Gly Ile Asn Tyr
 2020 2025 2030
 Ala Asp Arg Arg Trp Cys Phe Asp Gly Thr Arg Asn Asn Gln Ile Leu
 2035 2040 2045
 Glu Glu Asn Val Glu Val Glu Ile Trp Thr Lys Glu Gly Glu Arg Lys
 2050 2055 2060
 Lys Leu Lys Pro Arg Trp Leu Asp Ala Arg Ile Tyr Ser Asp Pro Leu
 2065 2070 2075 2080
 Ala Leu Lys Glu Phe Lys Glu Phe Ala Ala Gly Arg Lys Ser Leu Thr
 2085 2090 2095
 Leu Asn Leu Ile Thr Glu Met Gly Arg Leu Pro Thr Phe Met Thr Gln
 2100 2105 2110
 Lys Ala Arg Asp Ala Leu Asp Asn Leu Ala Val Leu His Thr Ala Glu
 2115 2120 2125
 Ala Gly Lys Lys Ala Tyr Asn His Ala Leu Ser Glu Leu Pro Glu Thr
 2130 2135 2140
 Leu Glu Thr Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Val Thr Gly Gly
 2145 2150 2155 2160
 Ile Phe Leu Phe Leu Met Ser Gly Arg Gly Met Gly Lys Met Thr Leu
 2165 2170 2175
 Gly Met Cys Cys Ile Ile Thr Ala Ser Ile Leu Leu Trp Tyr Ala Gln
 2180 2185 2190
 Ile Gln Pro His Trp Ile Ala Ala Ser Ile Ile Leu Glu Phe Phe Leu
 2195 2200 2205
 Ile Val Leu Leu Ile Pro Glu Pro Glu Lys Gln Arg Thr Pro Gln Asp
 2210 2215 2220
 Asn Gln Leu Thr Tyr Val Ile Ile Ala Ile Leu Thr Val Val Ala Ala
 2225 2230 2235 2240
 Thr Met Ala Asn Glu Met Gly Phe Leu Glu Lys Thr Lys Lys Asp Leu
 2245 2250 2255
 Gly Leu Gly Asn Ile Ala Thr Gln Gln Pro Glu Ser Asn Ile Leu Asp
 2260 2265 2270
 Ile Asp Leu Arg Pro Ala Ser Ala Trp Thr Leu Tyr Ala Val Ala Thr
 2275 2280 2285
 Thr Phe Ile Thr Pro Met Leu Arg His Ser Ile Glu Asn Ser Ser Val

ES 2 677 348 T3

Arg His Lys Lys Ala Thr Tyr Glu Pro Asp Val Asp Leu Gly Ser Gly
 2740 2745 2750
 Thr Arg Asn Ile Gly Ile Glu Ser Glu Thr Pro Asn Leu Asp Ile Ile
 2755 2760 2765
 Gly Lys Arg Ile Glu Lys Ile Lys Gln Glu His Glu Thr Ser Trp His
 2770 2775 2780
 Tyr Asp Gln Asp His Pro Tyr Lys Thr Trp Ala Tyr His Gly Ser Tyr
 2785 2790 2795 2800
 Glu Thr Lys Gln Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Val Asn Gly Val Val
 2805 2810 2815
 Arg Leu Leu Thr Lys Pro Trp Asp Val Val Pro Met Val Thr Gln Met
 2820 2825 2830
 Ala Met Thr Asp Thr Thr Pro Phe Gly Gln Gln Arg Val Phe Lys Glu
 2835 2840 2845
 Lys Val Asp Thr Arg Thr Gln Glu Pro Lys Glu Gly Thr Lys Lys Leu
 2850 2855 2860
 Met Lys Ile Thr Ala Glu Trp Leu Trp Lys Glu Leu Gly Lys Lys Lys
 2865 2870 2875 2880
 Thr Pro Arg Met Cys Thr Arg Glu Glu Phe Thr Lys Lys Val Arg Ser
 2885 2890 2895
 Asn Ala Ala Leu Gly Ala Ile Phe Thr Asp Glu Asn Lys Trp Lys Ser
 2900 2905 2910
 Ala Arg Glu Ala Val Glu Asp Ser Arg Phe Trp Glu Leu Val Asp Lys
 2915 2920 2925
 Glu Arg Asn Leu His Leu Glu Gly Lys Cys Glu Thr Cys Val Tyr Asn
 2930 2935 2940
 Met Met Gly Lys Arg Glu Lys Lys Leu Gly Glu Phe Gly Lys Ala Lys
 2945 2950 2955 2960
 Gly Ser Arg Ala Ile Trp Tyr Met Trp Leu Gly Ala Arg Phe Leu Glu
 2965 2970 2975
 Phe Glu Ala Leu Gly Phe Leu Asn Glu Asp His Trp Phe Ser Arg Glu
 2980 2985 2990
 Asn Ser Leu Ser Gly Val Glu Gly Glu Gly Leu His Lys Leu Gly Tyr
 2995 3000 3005
 Ile Leu Arg Glu Val Ser Lys Lys Glu Gly Gly Ala Met Tyr Ala Asp
 3010 3015 3020
 Asp Thr Ala Gly Trp Asp Thr Arg Ile Thr Ile Glu Asp Leu Lys Asn
 3025 3030 3035 3040
 Glu Glu Met Ile Thr Asn His Met Ala Gly Glu His Lys Lys Leu Ala
 3045 3050 3055
 Glu Ala Ile Phe Lys Leu Thr Tyr Gln Asn Lys Val Val Arg Val Gln
 3060 3065 3070
 Arg Pro Thr Pro Arg Gly Thr Val Met Asp Ile Ile Ser Arg Arg Asp
 3075 3080 3085
 Gln Arg Gly Ser Gly Gln Val Gly Thr Tyr Gly Leu Asn Thr Phe Thr
 3090 3095 3100
 Asn Met Glu Ala Gln Leu Ile Arg Gln Met Glu Gly Glu Gly Ile Phe
 3105 3110 3115 3120
 Lys Ser Ile Gln His Leu Thr Ala Ser Glu Glu Ile Ala Val Gln Asp
 3125 3130 3135
 Trp Leu Val Arg Val Gly Arg Glu Arg Leu Ser Arg Met Ala Ile Ser
 3140 3145 3150
 Gly Asp Asp Cys Val Val Lys Pro Leu Asp Asp Arg Phe Ala Arg Ala
 3155 3160 3165
 Leu Thr Ala Leu Asn Asp Met Gly Lys Val Arg Lys Asp Ile Gln Gln

ES 2 677 348 T3

| | | | | |
|---|--|------|--|------|
| 3170 | | 3175 | | 3180 |
| Trp Glu Pro Ser Arg Gly Trp Asn Asp Trp Thr Gln Val Pro Phe Cys | | | | |
| 3185 | | 3190 | | 3195 |
| Ser His His Phe His Glu Leu Ile Met Lys Asp Gly Arg Thr Leu Val | | | | 3200 |
| | | 3205 | | 3210 |
| Val Pro Cys Arg Asn Gln Asp Glu Leu Ile Gly Arg Ala Arg Ile Ser | | | | 3215 |
| | | 3220 | | 3225 |
| Gln Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Glu Thr Ala Cys Leu Gly Lys Ser | | | | 3230 |
| | | 3235 | | 3240 |
| Tyr Ala Gln Met Trp Ser Leu Met Tyr Phe His Arg Arg Asp Leu Arg | | | | 3245 |
| | | 3250 | | 3255 |
| Leu Ala Ala Asn Ala Ile Cys Ser Ala Val Pro Ser His Trp Ile Pro | | | | 3260 |
| | | 3265 | | 3270 |
| Thr Ser Arg Thr Thr Trp Ser Ile His Ala Ser His Glu Trp Met Thr | | | | 3275 |
| | | 3285 | | 3290 |
| Thr Glu Asp Met Leu Thr Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Leu Glu Asn | | | | 3295 |
| | | 3300 | | 3305 |
| Pro Trp Met Glu Asp Lys Thr Pro Val Glu Ser Trp Glu Glu Ile Pro | | | | 3310 |
| | | 3315 | | 3320 |
| Tyr Leu Gly Lys Arg Glu Asp Gln Trp Cys Gly Ser Leu Ile Gly Leu | | | | 3325 |
| | | 3330 | | 3335 |
| Thr Ser Arg Ala Thr Trp Ala Lys Asn Ile Gln Thr Ala Ile Asn Gln | | | | 3340 |
| | | 3345 | | 3350 |
| Val Arg Ser Leu Ile Gly Asn Glu Glu Tyr Thr Asp Tyr Met Pro Ser | | | | 3355 |
| | | 3365 | | 3370 |
| Met Lys Arg Phe Arg Arg Glu Glu Glu Glu Ala Gly Val Leu Trp | | | | 3375 |
| | | 3380 | | 3385 |
| | | | | 3390 |

<210> 48
 <211> 15153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Plásmido p3 del dengue 3

10

<400> 48

```

agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgact cggaagcttg cttaacgtag 60
tactgacagt tttttattag agagcagatc tctgatgaac aaccaacgga aaaagacggg 120
aaaaccgtct atcaatatgc tgaaacgcgt gagaaaccgt gtgtcaactg gatcacagtt 180
ggcgaagaga ttctcaagag gactgctgaa cggccaagga ccaatgaaat tggttatggc 240
gttcatagct ttctcagat ttctagccat tccaccgaca gcaggagtct tggctagatg 300
gggaaccctt aagaagtggg gggctattaa ggtcctgaga ggttcaaga aggagatctc 360
aaacatgctg agcattatca acagacggaa aaagacatcg ctctgtctca tgatgatggt 420
accagcaaca cttgctttcc acttgacttc acgagatgga gagccgcgca tgattgtggg 480
gaagaatgaa agaggaaaat cctactttt taagacagcc tctggaatca acatgtgcac 540
actcatagcc atggatttgg gagagatgtg tgatgacacg gtcacctaca aatgccccct 600
cattactgaa gtggagcctg aagacattga ctgctggtgc aaccttacat cgacatgggt 660
gacctacgga acgtgcaatc aagctggaga gcacagacgc gacaaaagat cgggtggcgtt 720
agctccccat gtcggcatgg gactggacac aogcaccdaa acctggatgt cggctgaagg 780
agctbggaga caggtcgaga aggtagagac atgggccttt aggcaccag ggttcacaat 840
actagcccta tttcttgccc attacatagg cacttccttg acccagaaag tggttatttt 900
catactacta atgctggtca ccccatccat gacaatgaga tgcgtgggag taggaaacag 960
agattttgtg gaaggcctat caggagctac gtgggttgac gtggtgctcg agcacggtgg 1020
    
```

ES 2 677 348 T3

gtgtgtgact accatggcta agaacaagcc cacgctggat atagagctcc agaaagaccga 1080
 ggccacccea ctggcgaccc taaggaaact atgtattgag ggaaaaatta ccaacgtaac 1140
 aaccgactca aggtgcccc cccaagggga agcgatttta cctgaggagc aggaccagaa 1200
 ccacgtgtgc aagcacacat acgtggacag aggctgggga aacggttgtg gtttgtttgg 1260
 caaggggaagc ctggtaacat gcgcgaaatt tcaatgtttg gaatcaatag agggaaaagt 1320
 ggtgcagcat gagaaacctc aatacacccgt catcatcaca gtgcacacag gagatcaaca 1380
 ccaggtggga aatgaaacgc agggagtcac ggctgagata acaccccagg catcaaccgt 1440
 tgaagccatc ttacctgaat atggaaccct tgggctagaa tgctcaccac ggacaggttt 1500
 agatttcaat gaaatgattt tgttgacaat gaagaacaaa gcatggatgg tacatagaca 1560
 atggtttttt gacctacctt taccatggac atcaggagct acaacagaaa caccaacctg 1620
 gaataagaaa gagcttcttg tgacattcaa aaacgcacat gcaaaaaagc aagaagttag 1680
 agtcttggga tgcgaagagg gagcaatgca cacagcactg acaggagcta cagagatcca 1740
 aacctcagga ggcacaagta tttttgcggg gcacttaaaa tgtagactca agatggacaa 1800
 attggaactc aaggggatga gctatgcaat gtgcttgaat gcctttgtgt tgaagaaaaga 1860
 agtctccgaa acgcaacatg ggacaatact catcaagggt gagtacaaaag gggaaagtgc 1920
 accttgcaag attcctttct ccacggagga tggacaaggg aaagcccaca atggcagact 1980
 gatcacagct aaccagtggt tgaccaagaa ggaggagcct gtcaatattg aggcagaacc 2040
 tctttttggg gaaagcaata tagtaattgg aattggagac aaagccttga aatcaactg 2100
 gtacaagaag ggaagctcga ttgggaagat gttcgaggcc actgcccagag gtgcaagggc 2160
 catggccatc ttgggagaca cagcctggga ctttggatca gttaggtggtg ttttaaaattc 2220
 attaggaaaa atggtgcacc aaatatttgg aagtgtttac acagccctat ttagtggagt 2280
 ctctgggata atgaaaattg gaataggtgt ccttttaacc tggataggggt tgaattcaaa 2340
 aaacactagt atgagcttta gctgcattgt gataggaatc attacactct atctgggagc 2400
 cgtggtgcaa gctgacatgg ggtgtgtcat aaactggaaa ggcaaaagaa tcaaatgtgg 2460
 aagtggaatt tctgtcacta atgaggbtca cacctggaca gagcaataca aatttcaagc 2520
 agactcccc aaaagactgg cgacagccat tgcaggcgct tgggagaatg gagtgtgcgg 2580
 aatcaggtcg acaaccagaa tggagaacct cttgtggaaag caaatagcca atgactgaa 2640
 ctacatatta tgggaaaaca acatcaaaat aacggttagt gtgggtgata taattgggtt 2700
 cttagagcaa gggaaaagaa cactaacacc acaaccatg gaactaaaat attcattgaa 2760
 aacatgggga aaggdgaaga tagtgacagc tgaaacacaa aattcctctt tcataataga 2820
 tgggccaaac acaccagagt gtccaagtgc ctcaagagca tggaatgtgt gggagtggga 2880
 agattacggg ttccggagtct tcacaactaa catatggctg aaactccgag agatgtacac 2940
 ccaactatgt gaccacaggg taatgtcggc agccgttaag gatgagaggg ccgtacacgc 3000
 cgactggggc tattggatag aaagccaaaa gaatggaagt tggaaagctag aaaaggtatc 3060
 cctcatagag gtaaaaaacct gcacatggcc aaaatcacac actcttttga gcaatggtgt 3120
 gctagagagt gacatgatca tcccagaagag tctggtggtt cccatttctgc aacacaacta 3180
 caggcccggg taccacaccc aaacggcagg accttggcac ttaggaaaaat tggagctgga 3240
 cttcaactat tgtgaaggaa caacagttgt catcacagaa aattgtggga caagaggccc 3300
 atcactgaga acaacaacag tgtcagggaa gttgatcac gaatggtgtt gccgctcgtg 3360
 tacacttctt cccctgcgat acatgggaga agacggctgc tggtatggca tggaaattag 3420
 accattaat gagaaagaag agaacatggt agaacttcta gtctcagcag ggagtggaaa 3480
 ggtggataac ttcaacaatg gtgtcttgtt tttggcaatc ctttttgaag aggtgatgag 3540
 aggaaaaattt gggaaaaagc acatgattgc aggggttctc ttcacgtttg tactccttct 3600
 ctccagggca ataacatgga gagacatggc gcaccacctc ataatgattg ggtccacccg 3660
 ctctgacaga atgggaatgg gcgtcactta cctagcattg attgcaacat ttaaaattca 3720
 gccatttttg gctttgggat tcttctgag gaaactgaca tctagagaaa atttattgtt 3780
 gggagtggg ttggccatgg caacaacggt acaactgcca gaggacattg aacaaatggc 3840
 gaatggaata gctttagggc tcatggctct taaattaata acacaatttg aaacatacca 3900
 actatggacg gcattagtct cctaattgtg tcaaatata attttcacgt tgactgttgc 3960
 ctggagaaca gccaccctga ttttggccgg aatttctctt ttgccagtgt gccagtcttc 4020
 gagcatgagg aaaacagatt ggctcccaat ggctgtggca gctatgggag tccacccct 4080
 accacttttt attttcagtt tgaagatac gctcaaaaag agaagctggc cactgaaatga 4140
 gggggtgatg gctgttggac ttgtgagtat tctagctagt tctctcctta ggaatgacgt 4200
 gcccatggct ggaccattag tggctggggg cttgctgata gcgtgctacg tcataactgg 4260
 cacgtcagca gacctcactg tagaaaaagc agcagatgtg acatgggagg aagaggctga 4320

ES 2 677 348 T3

gcaaacagga gtgtcccaca atttaatgat cacagttgat gacgatggaa caatgagaat 4380
aaaagatgat gagactgaga acatcttaac agtgcttttg aaaacagcat tactaatagt 4440
gtcaggcatt tttccatact ccataccgcg aacactgttg gtctggcaca cttggcaaaa 4500
gcaaacccaa agatccggtg toctatggga cgttcccagc ccccagaga cacagaaagc 4560
agaactggaa gaaggggttt ataggatcaa gcagcaagga atttttggga aaaccaagt 4620
gggggttggg gtacaaaaag aaggagtttt ccacaccatg tggcacgtca caagaggagc 4680
agtgttgaca cacaatggga aaagactgga accaaactgg gctagcgtga aaaaagatct 4740
gatttcatac ggaggaggat ggaaattgag tgcacaatgg caaaaaggag aggaggtgca 4800
ggttattgcc gtagagcctg ggaagaacct aaagaacttt caaacctgc caggcatttt 4860
ccagacaaca acaggggaga taggagcgat tgcactggac ttcaagcctg gaacttcagg 4920
atctcccatc ataaacagag agggaaaggt actgggattg tatggcaatg gagtggtcac 4980
aaagaatggt ggctatgtca gtggaatagc acaaacaaat gcagaaccag acggaccgac 5040
accagagttg gaagaagaga tgttcaaaaa gcgaaatcta accataatgg atctccatcc 5100
cgggtcaggg aagacgcgga aatatcttcc agctattgtt agagaggcaa tcaagagacg 5160
cttaaggact ctaatttttg caccaacaag ggtagtgtca gctgagatgg aagaagcatt 5220
gaaagggctc ccaataaggt atcaaacacac tgcaacaaaa totgaacaca cagggagaga 5280
gattgttgat ccaatgtgcc acgcaacggt cacaatgcgt ttgctgtcac cagtcagggt 5340
tccaaactac aacttgataa taatggatga ggctcatttc acagaccag ccagtatagc 5400
ggctagaggg tacatatcaa ctctgttagg aatgggagag gcagccgcaa tttctatgac 5460
agccacacc cctggaacag ctgatgcctt toctcagagc aacgctocaa ttcaagatga 5520
agaaaagagac ataccagaac gctcatggaa ttcaggcaat gaatggatta ccgactttgc 5580
cgggaagacg gtgtggtttg tocttagcat caaagctgga aatgacatag caaactgott 5640
gcggaaaaat ggaaaaaagg tcattcaact tagtaggaag acttttgaca cagaatatca 5700
aaagactaaa ctaaatgatt gggactttgt ggtgacaaca gacatttcag aaatgggagc 5760
caatttcaaa gcagacagag tgatcgacc aagaagatgt ctcaagccag tgattttgac 5820
agacggacc gagcgcgtga toctggcggg accaatgcca gtcaocgtag cgagcgtgc 5880
gcaaaggaga gggagagtgt gcaggaacct acaaaaaagaa aatgaccaat acatattcat 5940
gggccagccc ctcaataatg atgaagacca tgctcactgg acagaagcaa aaatgctgct 6000
agacaacatc aacacaccag aagggatcat accagctctc tttgaaccag aaagggagaa 6060
gtcagccgcc atagacggcg aatadccct gaaggggtgag tccaggaaga cctcgtgga 6120
actcatgagg aggggtganc toccagtttg gctagcccat aaagtagcat cagaagggat 6180
caaatataca gatagaaagt ggtgttttga tggagaacgc aacaatcaaa ttttagagga 6240
gaatatggat gtggaaatct ggacaaaagga aggagaaaaag aaaaaattga gacctagggtg 6300
gcttgatgcc cgcacttatt cagatccctt agcgtcaag gaattcaagg actttgoggc 6360
tggtagaaag tcaattgccc ttgatcttgt gacagaaata ggaagagtgc cttcacactt 6420
agctcacaga acgagaaaag ccctggacaa tctggtgatg ttgcaacgt cagaacatgg 6480
cgggagggcc tacaggcatg cagtggagga actaccagaa acaatggaaa caotcttact 6540
cctgggactc atgatcctgt taacaggtgg agcaatgott ttottgatat caggtaaagg 6600
gattggaaag acttcaatag gactcatttg tgtagctgct tccagoggta tgttatggat 6660
ggctgatgtc ccactccaat ggatcgcgtc tgccatagtc ctggagtttt ttatgatggt 6720
gtaacttata ccagaaccag aaaagcagag aactcccaa gacaatcaac tgcgatatgt 6780
cgtgatagga atactcacac tggctgcaat agtagcagcc aatgaaatgg gactgttggg 6840
aaccacaaag agagatttag gaatgtccaa agaaccaggt gttgtttctc caaccagcta 6900
ttgggatgtg gacttgcaac cagcatcagc ctggacattg tacgtgtggt ccacaacagt 6960
aataacacca atgttgagac ataccataga gaattccaca gcaaatgtgt cctggcagc 7020
tatagccaac caggcagtgg toctgatggg tttagacaaa ggatggccga tatogaaaat 7080
ggacttaggc gtgccactat tggcactggg ttgttattca caagtgaacc cactaactct 7140
cacagcggca gttctcctgc tagtcacgca ttatgctatt ataggtocag gattgcaggc 7200
aaaagccact cgtgaagctc aaaaaaggac agctgctgga ataatgaaga atccaacggg 7260
ggatgggata atgacaatag acctagatcc tgtaatatac gattcaaat ttgaaaagca 7320
actaggacag gttatgctcc tggttctgtg tgcagttcaa cttttgttaa tgagaacatc 7380
atgggctttt tgtgaagctc taaccctagc cacaggacca ataacaacac totgggaagg 7440
atcacctggg aagttctgga acaccacgat agctgtttcc atggcgaaca totttagagg 7500
gagctattha gcaggagctg ggcttgcttt ttctatcatg aaatcagttg gaacaggaaa 7560
gagagggaca ggttcacagg gtgaaacctt gggagaaaag tggaaaaaga aattgaaatca 7620

attacccccg aaagagtttg acctttacaa gaaatccgga atcactgaag tggatagaac 7680
 agaagccaaa gaagggttga aaagaggaga aataacacac catgccgtgt ccagaggcag 7740
 cgcaaaactt caatgggtcg tggagagaaa catggctcacc cccgaaggaa gagtcataga 7800
 cttaggctgt ggaagaggag gctggtcata ttattgtgca ggactgaaaa aagttacaga 7860
 agtgcgagga tacacaaaag gcggcccagg acatgaagaa ccagtaccta tgtctacata 7920
 cggatggaac atagtcaagt taatgagtgg aaaggatgtg ttttatcttc cacctgaaaa 7980
 gtgtgatact ctattgtgtg acattggaga atcttcacca agcccaacag tgggaagaaag 8040
 cagaaccata agagtcttga agatggttga accatggcta aaaaataacc agttttgcat 8100
 taaagtattg aacccttaca tgccaactgt gattgagcac ctagaagagac tacaaaggaa 8160
 acatggaggga atgcttgtga gaaatccact ctcacgaaac tccacgcacg aatgttactg 8220
 gatctctaag ggcacaggca atatcgtttc ttcagtcacac atgggtatcca gattgctact 8280
 taacagattc acaatgacac ataggagacc caccatagag aaagatgtgg atttaggagc 8340
 ggggaccoga catgtcaatg cggaaaccaga aacacccaac atggatgtca ttggggaaag 8400
 aataagaagg atcaaggagg agcatagtcc aacatggcac tatgatgatg aaaatcctta 8460
 taaaaactgg gcttaccatg gatcctatga agttaaggcc acaggctcag cctcctccat 8520
 gataaatgga gtcgtgaaac tcctcacgaa accatgggat gtggtgcca tgggtgacaca 8580
 gatggcaatg acggatacaa cccattcgg ccagcaaagg gtttttaag agaaagtggg 8640
 caccaggaca cccagaccta tgccaggaaac aagaaagggt atggagatca cagcggaatg 8700
 gctttggaga accctgggaa ggaacaaaag acccagatta tgtacgagag aggagttcac 8760
 aaaaaaggct agaaccacg cagctatggg cgccgttttt acagaggaga accaatggga 8820
 cagtgcctaga gctgctgttg aggatgaaga attctggaaa ctctgtggaca gagaacgtga 8880
 actccacaaa ttgggcaagt gtggaagctg cgtttacaac atgatgggca agagagagaa 8940
 gaaacttggg gagtttggca aagcaaaagg cagttagacc atatggtaca tgtggttggg 9000
 agccagatag cttgagttcg aagcactcgg attcttaaat gaagaccatt ggttctcggc 9060
 tgaaaactct tacagtggag tagaaggaga aggactgcac aagctgggat acatcttaag 9120
 agacatttcc aagataccgg gaggagctat gtatgctgat gacacagctg gttgggacac 9180
 aagaataaca gaagatgacc tgcacaatga ggaaaaaatc acacagcaaa tggaccctga 9240
 acacaggcag tttagcaaac ctatattcaa gctcacatcc caaaacaaag tggctcaaatg 9300
 tcaacgacca actccaagg gcacggtaat ggacatcata tctaggaaaag accaaagagg 9360
 cagtggacag gtgggaactt atgggtctgaa tacattcacc aacatggaag cccagttaat 9420
 cagacaaatg gaaggagaaag gtgtgtgtgc gaaggcagac ctccggaacc ctcatctgct 9480
 agagaagaaa gttacacaat ggttggaaac aaaaggagtg gagaggttaa aaagaatggc 9540
 catcagcggg gatgattcgg tgggtgaaacc aattgatgac aggttccgca atgcccctgt 9600
 tgccctgaat gacatgggaa aagttaggaa ygacatacct caatggcagc catcaaaagg 9660
 atggcatgat tggcaacagg tccctttctg ctcccaccac tttcatgaat tgatcatgaa 9720
 agatggaaaga aagttggtag ttccctgcaag acctcaggat gaattaatcg ggagagcag 9780
 aatctctcaa ggagcaggat ggagccttag agaaactgca tgcctaggga aagcctacgc 9840
 ccaaatgtgg actctcatgt actttcacag aagagatctt agactagcat ccaacgccat 9900
 atgttcagca gtaccagtc accatgggtccc cacaagcaga acgacgtggt ctattcatgc 9960
 tcaccatcag tggatgacta cagaagacat gcttactggt tggaacaggg tgtggataga 10020
 ggataatcca tggatggaag acaaaactcc agtcaaaacc tgggaagatg ttccatatct 10080
 agggaagaga gaagaccaat ggtgoggatc actcattggt ctcaacttcca gagcaacctg 10140
 ggcccagaac atacttacgg caatccaaca ggtgagaagc cttataggca atgaagagt 10200
 tctggactan atgcocttoga tgaagagath naggaaggag gaggagtcag agggagccat 10260
 ttggtaaaag taggaagtga aaaagaggca aactgtcagg ccaccttaag ccaacgtacg 10320
 gaagaagctg tgcagcctgt gagcccctgc caaggacggt aaaagaagaa gtcaggccca 10380
 aaagccacgg tttgagcaaa ccgtgctgdc tgtggctccg tctggtgggac gtaaaaactg 10440
 ggaggctgca aactgtgtaa gctgtacgca cgggtgtagca gactagcgggt tagaggagac 10500
 cctcccctag acacaacgca gcagcggggc ccgagctctg agggaaagctg tacctccttg 10560
 caaaggacta gaggttagag gagaccccc gcaataaaaa acagcatatt gacgctggga 10620
 gagaccagag atcctgctgt ctccctcagca tcattccagg cacagaacgc cagaaaatgg 10680
 aatggtgctg ttgaatcaac aggttctggt accggtaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 10740
 gtttggatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatccc 10800
 catggtgtgc aaaaaagcgg tttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagt 10860
 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgctatgcc 10920

atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 10980
tatggggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgcacatag 11040
cagaacttta aaagtgotca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 11100
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc 11160
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcccgaaa 11220
aaaggggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttctttt ttcaatatta 11280
ttgaagcatt tatcaggggtt atgtgtcat gagcggatac atatttgaat gtattttagaa 11340
aaataaacaa ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 11400
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11460
tcaagaatte tcatgtttga cagcttatca tcgataagct ttaatgcggt agtttatcac 11520
agttaaattg ctaacgcagt caggcacctg gtatgaaatc taacaatgcg ctcatcgtca 11580
tcctcggcac cgtcacctcg gatgctgtag gcataggcct ggttatgccg gtactgccgg 11640
gocctctgog ggatatcgtc cattccgaca gcatcgccag tcaactatggc gtgctgctgg 11700
cgctatatgc gttgatgcaa tttctatgog cacccttctt cggagcactg tccgaccgct 11760
tggccggcgg cccagtcctg ctgccttgcg tacttggagc cactatcgac tacgcgatca 11820
tggcgaccac acccgtcctg tggatcctct acgcccggac catcgtggcc ggcatcaccg 11880
gcgccacagg tgcggttgct ggccctata tcgcccacat caccgatggg gaagatcggg 11940
ctcgccaact cgggctcatg agcgttgtt tcggcgtggg tatggtggca ggcccgtgg 12000
ccgggggact gttggggcgc atctccttgc atgcaccatt ccttgccggc gccgtgctca 12060
acggcctcaa cctactactg ggctgcttcc taatgcagga gtgcataag ggagagcgtc 12120
gaccgatgoc cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt ccggtggggc cggggcatga 12180
ctatcgtcgc cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgttagga caggtagccg 12240
cagcgtctg ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgtcg gagcgcgacg atgatcggc 12300
tgtcgttgc ggtattcgga atcttgacg cctcgtcga agccttcgtc actggctccg 12360
ccaccaaacg tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccgg catggcggcc gacgcgctgg 12420
gctacgtctt gctggcgttc gcgacgcgag gctggatggc cttcccatt atgattcttc 12480
tcgcttccgg cggcatcggg atgcccgcgt tgcaggccat gctgtccagg caggtagatg 12540
acgaccatca gggacagctt caaggatcgc tcgcccgtct taccagccta acttcgatca 12600
ctggaccgct gatcgtcacg gcgatttatg ccgctcggc gagcacatgg aacgggttgg 12660
catggattgt aggcgcgcgc ctataccttg tctgcctccc cgcgttgcgt cgcggtgcat 12720
ggagccgggc cactcgacc tgaatggaag ccggccggac ctgcctaacg gattcaccac 12780
tccaagaatt ggagccaatc aattcttgcg gagaactgtg aatgcgcaaa ccaacccttg 12840
gcagaacata tccatcgcgt ccgccatctc cagcagccgc acgcccgcga tctcgggcag 12900
cgttgggtcc tggccacygg tgcgatgat cgtgctcctg tcgttgagga ccggctagg 12960
ctggcggggt tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg atacgcgagc gaacgtgaag 13020
cgactgctgc tgcaaaacgt ctgcgacctg agcaacaaca tgaatggtct tgggtttccg 13080
tgtttcgtaa agtctggaaa cgcggaagtc agcgcctgc accattatgt tccggatctg 13140
catcgcagga tgcgtgtggt taccctgtgg aacacctaca tctgtattaa cgaagcgtg 13200
gcattgacc tgagtgattt ttctctggtc ccgcgcctc cataccgcca gttgtttacc 13260
ctcacaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta acccgtatcg tgagcatcct 13320
ctctcgtttc atcggtatca ttacccccat gaacagaaat cccccttaca cggaggcctc 13380
agtgaocaaa caggaaaaaa ccgcctttaa catggcccgc tttatcagaa gccagacatt 13440
aacgcttctg gagaaactca acgagctgga ccgggatgaa caggcagaca tctgtgaatc 13500
gcttcaegac cagcgtgatg agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcc gtgatgacgg 13560
tgaaaacctc tgacacatgc agctcccggg gacggtcaca gcttgtctgt aagcgggatg 13620
cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggggggtgtc ggggcgcagc 13680
catgaccag tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc ggcacagag 13740
cagattgtac tgagagtgca ccatatcggg tgtgaaatc cgcacagatg cgtaggaga 13800
aaataccgca tcaggcctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtctgc ctccgtctgt 13860
cggctgccc gagcgttatc agctcactca aaggcggtaa tacggttato cacagaatca 13920
ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa 13980
aaggccgctg tctggcgtt ttccatagg ctcccctccc ctgacgagca tcacaaaaat 14040
cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 14100
cctggaagct cctcgtgog ctctcctgtt ccgaccctgc cgttaaccgg atacctgtc 14160
gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 14220

ES 2 677 348 T3

```

tcgggtgtagg tcggttcgctc caagctggggc tgtgtgcacg aacccccctg tccagcccga 14280
cgctgocgct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgaattatcg 14340
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca 14400
gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc 14460
gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaaa 14520
accacogctg gtagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa 14580
ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac 14640
tcacgttaag ggatttttgg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta 14700
aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gctctgacagt 14760
taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttctg ttcacccata 14820
gttgccctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg egggttacc atctggcccc 14880
agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac 14940
cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 15000
tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac 15060
gttgttgcca ttgctgcaag atctggctag cgatgacct gctgattggt tcgctgacca 15120
tttccggggc gcgcgattta ggtgacacta tag 15153

```

<210> 49
 <211> 3390
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue 3 (Sleman/78)

5

<400> 49

```

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

```

10

ES 2 677 348 T3

Ala Phe Arg His Pro Gly Phe Thr Ile Leu Ala Leu Phe Leu Ala His
 245 250 255
 Tyr Ile Gly Thr Ser Leu Thr Gln Lys Val Val Ile Phe Ile Leu Leu
 260 265 270
 Met Leu Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn
 275 280 285
 Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val
 290 295 300
 Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr
 305 310 315 320
 Leu Asp Ile Glu Leu Gln Lys Thr Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu
 325 330 335
 Arg Lys Leu Cys Ile Glu Gly Lys Ile Thr Asn Val Thr Thr Asp Ser
 340 345 350
 Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Ile Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln
 355 360 365
 Asn His Val Cys Lys His Thr Tyr Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly
 370 375 380
 Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln
 385 390 395 400
 Cys Leu Glu Ser Ile Glu Gly Lys Val Val Gln His Glu Asn Leu Lys
 405 410 415
 Tyr Thr Val Ile Ile Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly
 420 425 430
 Asn Glu Thr Gln Gly Val Thr Ala Glu Ile Thr Pro Gln Ala Ser Thr
 435 440 445
 Val Glu Ala Ile Leu Pro Glu Tyr Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser
 450 455 460
 Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys
 465 470 475 480
 Asn Lys Ala Trp Met Val His Arg Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu
 485 490 495
 Pro Trp Thr Ser Gly Ala Thr Thr Glu Thr Pro Thr Trp Asn Lys Lys
 500 505 510
 Glu Leu Leu Val Thr Phe Lys Asn Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val
 515 520 525
 Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly
 530 535 540
 Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His
 545 550 555 560
 Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser
 565 570 575
 Tyr Ala Met Cys Leu Asn Ala Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu
 580 585 590
 Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp
 595 600 605
 Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala
 610 615 620
 His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu
 625 630 635 640
 Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile
 645 650 655
 Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys
 660 665 670
 Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg

ES 2 677 348 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | |
| Arg | Met | Ala | Ile | Leu | Gly | Asp | Thr | Ala | Trp | Asp | Phe | Gly | Ser | Val | Gly |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | |
| Gly | Val | Leu | Asn | Ser | Leu | Gly | Lys | Met | Val | His | Gln | Ile | Phe | Gly | Ser |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 |
| Ala | Tyr | Thr | Ala | Leu | Phe | Ser | Gly | Val | Ser | Trp | Ile | Met | Lys | Ile | Gly |
| | | | | 725 | | | | | | 730 | | | | | 735 |
| Ile | Gly | Val | Leu | Leu | Thr | Trp | Ile | Gly | Leu | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Ser |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | |
| Met | Ser | Phe | Ser | Cys | Ile | Val | Ile | Gly | Ile | Ile | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gly |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | | 765 | | |
| Ala | Val | Val | Gln | Ala | Asp | Met | Gly | Cys | Val | Ile | Asn | Trp | Lys | Gly | Lys |
| | | 770 | | | | 775 | | | | | 780 | | | | |
| Glu | Leu | Lys | Cys | Gly | Ser | Gly | Ile | Phe | Val | Thr | Asn | Glu | Val | His | Thr |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 |
| Trp | Thr | Glu | Gln | Tyr | Lys | Phe | Gln | Ala | Asp | Ser | Pro | Lys | Arg | Leu | Ala |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | | 815 |
| Thr | Ala | Ile | Ala | Gly | Ala | Trp | Glu | Asn | Gly | Val | Cys | Gly | Ile | Arg | Ser |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | |
| Thr | Thr | Arg | Met | Glu | Asn | Leu | Leu | Trp | Lys | Gln | Ile | Ala | Asn | Glu | Leu |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | |
| Asn | Tyr | Ile | Leu | Trp | Glu | Asn | Asn | Ile | Lys | Leu | Thr | Val | Val | Val | Gly |
| | 850 | | | | 855 | | | | | | 860 | | | | |
| Asp | Ile | Ile | Gly | Val | Leu | Glu | Gln | Gly | Lys | Arg | Thr | Leu | Thr | Pro | Gln |
| 865 | | | | 870 | | | | | | 875 | | | | | 880 |
| Pro | Met | Glu | Leu | Lys | Tyr | Ser | Trp | Lys | Thr | Trp | Gly | Lys | Ala | Lys | Ile |
| | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | | 895 |
| Val | Thr | Ala | Glu | Thr | Gln | Asn | Ser | Ser | Phe | Ile | Ile | Asp | Gly | Pro | Asn |
| | | | 900 | | | | | 905 | | | | | 910 | | |
| Thr | Pro | Glu | Cys | Pro | Ser | Ala | Ser | Arg | Ala | Trp | Asn | Val | Trp | Glu | Val |
| | | 915 | | | | | 920 | | | | | 925 | | | |
| Glu | Asp | Tyr | Gly | Phe | Gly | Val | Phe | Thr | Thr | Asn | Ile | Trp | Leu | Lys | Leu |
| | 930 | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | |
| Arg | Glu | Met | Tyr | Thr | Gln | Leu | Cys | Asp | His | Arg | Leu | Met | Ser | Ala | Ala |
| 945 | | | | | 950 | | | | | 955 | | | | | 960 |
| Val | Lys | Asp | Glu | Arg | Ala | Val | His | Ala | Asp | Met | Gly | Tyr | Trp | Ile | Glu |
| | | | | 965 | | | | | 970 | | | | | | 975 |
| Ser | Gln | Lys | Asn | Gly | Ser | Trp | Lys | Leu | Glu | Lys | Ala | Ser | Leu | Ile | Glu |
| | | | 980 | | | | | 985 | | | | | 990 | | |
| Val | Lys | Thr | Cys | Thr | Trp | Pro | Lys | Ser | His | Thr | Leu | Trp | Ser | Asn | Gly |
| | | 995 | | | | | 1000 | | | | | | 1005 | | |
| Val | Leu | Glu | Ser | Asp | Met | Ile | Ile | Pro | Lys | Ser | Leu | Ala | Gly | Pro | Ile |
| | 1010 | | | | | 1015 | | | | | 1020 | | | | |
| Ser | Gln | His | Asn | Tyr | Arg | Pro | Gly | Tyr | His | Thr | Gln | Thr | Ala | Gly | Pro |
| 1025 | | | | | 1030 | | | | | 1035 | | | | | 1040 |
| Trp | His | Leu | Gly | Lys | Leu | Glu | Leu | Asp | Phe | Asn | Tyr | Cys | Glu | Gly | Thr |
| | | | | 1045 | | | | | 1050 | | | | | | 1055 |
| Thr | Val | Val | Ile | Thr | Glu | Asn | Cys | Gly | Thr | Arg | Gly | Pro | Ser | Leu | Arg |
| | | | 1060 | | | | | 1065 | | | | | | 1070 | |
| Thr | Thr | Thr | Val | Ser | Gly | Lys | Leu | Ile | His | Glu | Trp | Cys | Cys | Arg | Ser |
| | | 1075 | | | | | 1080 | | | | | 1085 | | | |
| Cys | Thr | Leu | Pro | Pro | Leu | Arg | Tyr | Met | Gly | Glu | Asp | Gly | Cys | Trp | Tyr |
| | 1090 | | | | | 1095 | | | | | 1100 | | | | |
| Gly | Met | Glu | Ile | Arg | Pro | Ile | Asn | Glu | Lys | Glu | Glu | Asn | Met | Val | Lys |
| 1105 | | | | | 1110 | | | | | 1115 | | | | | 1120 |

ES 2 677 348 T3

Ser Leu Val Ser Ala Gly Ser Gly Lys Val Asp Asn Phe Thr Met Gly
1125 1130 1135
Val Leu Cys Leu Ala Ile Leu Phe Glu Glu Val Met Arg Gly Lys Phe
1140 1145 1150
Gly Lys Lys His Met Ile Ala Gly Val Leu Phe Thr Phe Val Leu Leu
1155 1160 1165
Leu Ser Gly Gln Ile Thr Trp Arg Asp Met Ala His Thr Leu Ile Met
1170 1175 1180
Ile Gly Ser Asn Ala Ser Asp Arg Met Gly Met Gly Val Thr Tyr Leu
1185 1190 1195 1200
Ala Leu Ile Ala Thr Phe Lys Ile Gln Pro Phe Leu Ala Leu Gly Phe
1205 1210 1215
Phe Leu Arg Lys Leu Thr Ser Arg Glu Asn Leu Leu Leu Gly Val Gly
1220 1225 1230
Leu Ala Met Ala Thr Thr Leu Gln Leu Pro Glu Asp Ile Glu Gln Met
1235 1240 1245
Ala Asn Gly Ile Ala Leu Gly Leu Met Ala Leu Lys Leu Ile Thr Gln
1250 1255 1260
Phe Glu Thr Tyr Gln Leu Trp Thr Ala Leu Val Ser Leu Met Cys Ser
1265 1270 1275 1280
Asn Thr Ile Phe Thr Leu Thr Val Ala Trp Arg Thr Ala Thr Leu Ile
1285 1290 1295
Leu Ala Gly Ile Ser Leu Leu Pro Val Cys Gln Ser Ser Ser Met Arg
1300 1305 1310
Lys Thr Asp Trp Leu Pro Met Ala Val Ala Ala Met Gly Val Pro Pro
1315 1320 1325
Leu Pro Leu Phe Ile Phe Ser Leu Lys Asp Thr Leu Lys Arg Arg Ser
1330 1335 1340
Trp Pro Leu Asn Glu Gly Val Met Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Leu
1345 1350 1355 1360
Ala Ser Ser Leu Leu Arg Asn Asp Val Pro Met Ala Gly Pro Leu Val
1365 1370 1375
Ala Gly Gly Leu Leu Ile Ala Cys Tyr Val Ile Thr Gly Thr Ser Ala
1380 1385 1390
Asp Leu Thr Val Glu Lys Ala Ala Asp Val Thr Trp Glu Glu Glu Ala
1395 1400 1405
Glu Gln Thr Gly Val Ser His Asn Leu Met Ile Thr Val Asp Asp Asp
1410 1415 1420
Gly Thr Met Arg Ile Lys Asp Asp Glu Thr Glu Asn Ile Leu Thr Val
1425 1430 1435 1440
Leu Leu Lys Thr Ala Leu Leu Ile Val Ser Gly Ile Phe Pro Tyr Ser
1445 1450 1455
Ile Pro Ala Thr Leu Leu Val Trp His Thr Trp Gln Lys Gln Thr Gln
1460 1465 1470
Arg Ser Gly Val Leu Trp Asp Val Pro Ser Pro Pro Glu Thr Gln Lys
1475 1480 1485
Ala Glu Leu Glu Glu Gly Val Tyr Arg Ile Lys Gln Gln Gly Ile Phe
1490 1495 1500
Gly Lys Thr Gln Val Gly Val Gly Val Gln Lys Glu Gly Val Phe His
1505 1510 1515 1520
Thr Met Trp His Val Thr Arg Gly Ala Val Leu Thr His Asn Gly Lys
1525 1530 1535
Arg Leu Glu Pro Asn Trp Ala Ser Val Lys Lys Asp Leu Ile Ser Tyr
1540 1545 1550
Gly Gly Gly Trp Lys Leu Ser Ala Gln Trp Gln Lys Gly Glu Glu Val

ES 2 677 348 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1555 | | 1560 | | 1565 | | | | | | | | | | |
| Gln | Val | Ile | Ala | Val | Glu | Pro | Gly | Lys | Asn | Pro | Lys | Asn | Phe | Gln | Thr |
| | 1570 | | | | | 1575 | | | | | 1580 | | | | |
| Met | Pro | Gly | Ile | Phe | Gln | Thr | Thr | Thr | Gly | Glu | Ile | Gly | Ala | Ile | Ala |
| 1585 | | | | | 1590 | | | | | 1595 | | | | | 1600 |
| Leu | Asp | Phe | Lys | Pro | Gly | Thr | Ser | Gly | Ser | Pro | Ile | Ile | Asn | Arg | Glu |
| | | | | 1605 | | | | | 1610 | | | | | 1615 | |
| Gly | Lys | Val | Leu | Gly | Leu | Tyr | Gly | Asn | Gly | Val | Val | Thr | Lys | Asn | Gly |
| | | | 1620 | | | | | 1625 | | | | | 1630 | | |
| Gly | Tyr | Val | Ser | Gly | Ile | Ala | Gln | Thr | Asn | Ala | Glu | Pro | Asp | Gly | Pro |
| | 1635 | | | | | | 1640 | | | | | 1645 | | | |
| Thr | Pro | Glu | Leu | Glu | Glu | Glu | Met | Phe | Lys | Lys | Arg | Asn | Leu | Thr | Ile |
| | 1650 | | | | | 1655 | | | | | 1660 | | | | |
| Met | Asp | Leu | His | Pro | Gly | Ser | Gly | Lys | Thr | Arg | Lys | Tyr | Leu | Pro | Ala |
| 1665 | | | | | 1670 | | | | | 1675 | | | | | 1680 |
| Ile | Val | Arg | Glu | Ala | Ile | Lys | Arg | Arg | Leu | Arg | Thr | Leu | Ile | Leu | Ala |
| | | | 1685 | | | | | | 1690 | | | | | 1695 | |
| Pro | Thr | Arg | Val | Val | Ala | Ala | Glu | Met | Glu | Glu | Ala | Leu | Lys | Gly | Leu |
| | | | 1700 | | | | | 1705 | | | | | | 1710 | |
| Pro | Ile | Arg | Tyr | Gln | Thr | Thr | Ala | Thr | Lys | Ser | Glu | His | Thr | Gly | Arg |
| | 1715 | | | | | | 1720 | | | | | | 1725 | | |
| Glu | Ile | Val | Asp | Leu | Met | Cys | His | Ala | Thr | Phe | Thr | Met | Arg | Leu | Leu |
| | 1730 | | | | 1735 | | | | | | 1740 | | | | |
| Ser | Pro | Val | Arg | Val | Pro | Asn | Tyr | Asn | Leu | Ile | Ile | Met | Asp | Glu | Ala |
| 1745 | | | | | 1750 | | | | | 1755 | | | | | 1760 |
| His | Phe | Thr | Asp | Pro | Ala | Ser | Ile | Ala | Ala | Arg | Gly | Tyr | Ile | Ser | Thr |
| | | | 1765 | | | | | | 1770 | | | | | 1775 | |
| Arg | Val | Gly | Met | Gly | Glu | Ala | Ala | Ala | Ile | Phe | Met | Thr | Ala | Thr | Pro |
| | | | 1780 | | | | | 1785 | | | | | | 1790 | |
| Pro | Gly | Thr | Ala | Asp | Ala | Phe | Pro | Gln | Ser | Asn | Ala | Pro | Ile | Gln | Asp |
| | 1795 | | | | | | 1800 | | | | | 1805 | | | |
| Glu | Glu | Arg | Asp | Ile | Pro | Glu | Arg | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Asn | Glu | Trp |
| | 1810 | | | | 1815 | | | | | | 1820 | | | | |
| Ile | Thr | Asp | Phe | Ala | Gly | Lys | Thr | Val | Trp | Phe | Val | Pro | Ser | Ile | Lys |
| 1825 | | | | | 1830 | | | | | 1835 | | | | | 1840 |
| Ala | Gly | Asn | Asp | Ile | Ala | Asn | Cys | Leu | Arg | Lys | Asn | Gly | Lys | Lys | Val |
| | | | 1845 | | | | | | 1850 | | | | | 1855 | |
| Ile | Gln | Leu | Ser | Arg | Lys | Thr | Phe | Asp | Thr | Glu | Tyr | Gln | Lys | Thr | Lys |
| | | 1860 | | | | | | 1865 | | | | | | 1870 | |
| Leu | Asn | Asp | Trp | Asp | Phe | Val | Val | Thr | Thr | Asp | Ile | Ser | Glu | Met | Gly |
| | 1875 | | | | | | 1880 | | | | | 1885 | | | |
| Ala | Asn | Phe | Lys | Ala | Asp | Arg | Val | Ile | Asp | Pro | Arg | Arg | Cys | Leu | Lys |
| | 1890 | | | | 1895 | | | | | 1900 | | | | | |
| Pro | Val | Ile | Leu | Thr | Asp | Gly | Pro | Glu | Arg | Val | Ile | Leu | Ala | Gly | Pro |
| 1905 | | | | | 1910 | | | | | 1915 | | | | | 1920 |
| Met | Pro | Val | Thr | Val | Ala | Ser | Ala | Ala | Gln | Arg | Arg | Gly | Arg | Val | Gly |
| | | | 1925 | | | | | | 1930 | | | | | 1935 | |
| Arg | Asn | Pro | Gln | Lys | Glu | Asn | Asp | Gln | Tyr | Ile | Phe | Met | Gly | Gln | Pro |
| | | 1940 | | | | | | 1945 | | | | | | 1950 | |
| Leu | Asn | Asn | Asp | Glu | Asp | His | Ala | His | Trp | Thr | Glu | Ala | Lys | Met | Leu |
| | 1955 | | | | | | 1960 | | | | | | | 1965 | |
| Leu | Asp | Asn | Ile | Asn | Thr | Pro | Glu | Gly | Ile | Ile | Pro | Ala | Leu | Phe | Glu |
| | 1970 | | | | | 1975 | | | | | 1980 | | | | |
| Pro | Glu | Arg | Glu | Lys | Ser | Ala | Ala | Ile | Asp | Gly | Glu | Tyr | Arg | Leu | Lys |
| 1985 | | | | | 1990 | | | | | 1995 | | | | | 2000 |

ES 2 677 348 T3

Gly Glu Ser Arg Lys Thr Phe Val Glu Leu Met Arg Arg Gly Asp Leu
 2005 2010 2015
 Pro Val Trp Leu Ala His Lys Val Ala Ser Glu Gly Ile Lys Tyr Thr
 2020 2025 2030
 Asp Arg Lys Trp Cys Phe Asp Gly Glu Arg Asn Asn Gln Ile Leu Glu
 2035 2040 2045
 Glu Asn Met Asp Val Glu Ile Trp Thr Lys Glu Gly Glu Lys Lys Lys
 2050 2055 2060
 Leu Arg Pro Arg Trp Leu Asp Ala Arg Thr Tyr Ser Asp Pro Leu Ala
 2065 2070 2075 2080
 Leu Lys Glu Phe Lys Asp Phe Ala Ala Gly Arg Lys Ser Ile Ala Leu
 2085 2090 2095
 Asp Leu Val Thr Glu Ile Gly Arg Val Pro Ser His Leu Ala His Arg
 2100 2105 2110
 Thr Arg Asn Ala Leu Asp Asn Leu Val Met Leu His Thr Ser Glu His
 2115 2120 2125
 Gly Gly Arg Ala Tyr Arg His Ala Val Glu Glu Leu Pro Glu Thr Met
 2130 2135 2140
 Glu Thr Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Gly Gly Ala
 2145 2150 2155 2160
 Met Leu Phe Leu Ile Ser Gly Lys Gly Ile Gly Lys Thr Ser Ile Gly
 2165 2170 2175
 Leu Ile Cys Val Ala Ala Ser Ser Gly Met Leu Trp Met Ala Asp Val
 2180 2185 2190
 Pro Leu Gln Trp Ile Ala Ser Ala Ile Val Leu Glu Phe Phe Met Met
 2195 2200 2205
 Val Leu Leu Ile Pro Glu Pro Glu Lys Gln Arg Thr Pro Gln Asp Asn
 2210 2215 2220
 Gln Leu Ala Tyr Val Val Ile Gly Ile Leu Thr Leu Ala Ala Ile Val
 2225 2230 2235 2240
 Ala Ala Asn Glu Met Gly Leu Leu Glu Thr Thr Lys Arg Asp Leu Gly
 2245 2250 2255
 Met Ser Lys Glu Pro Gly Val Val Ser Pro Thr Ser Tyr Leu Asp Val
 2260 2265 2270
 Asp Leu His Pro Ala Ser Ala Trp Thr Leu Tyr Ala Val Ala Thr Thr
 2275 2280 2285
 Val Ile Thr Pro Met Leu Arg His Thr Ile Glu Asn Ser Thr Ala Asn
 2290 2295 2300
 Val Ser Leu Ala Ala Ile Ala Asn Gln Ala Val Val Leu Met Gly Leu
 2305 2310 2315 2320
 Asp Lys Gly Trp Pro Ile Ser Lys Met Asp Leu Gly Val Pro Leu Leu
 2325 2330 2335
 Ala Leu Gly Cys Tyr Ser Gln Val Asn Pro Leu Thr Leu Thr Ala Ala
 2340 2345 2350
 Val Leu Leu Leu Val Thr His Tyr Ala Ile Ile Gly Pro Gly Leu Gln
 2355 2360 2365
 Ala Lys Ala Thr Arg Glu Ala Gln Lys Arg Thr Ala Ala Gly Ile Met
 2370 2375 2380
 Lys Asn Pro Thr Val Asp Gly Ile Met Thr Ile Asp Leu Asp Pro Val
 2385 2390 2395 2400
 Ile Tyr Asp Ser Lys Phe Glu Lys Gln Leu Gly Gln Val Met Leu Leu
 2405 2410 2415
 Val Leu Cys Ala Val Gln Leu Leu Leu Met Arg Thr Ser Trp Ala Phe
 2420 2425 2430
 Cys Glu Ala Leu Thr Leu Ala Thr Gly Pro Ile Thr Thr Leu Trp Glu

ES 2 677 348 T3

Arg Leu Cys Thr Arg Glu Glu Phe Thr Lys Lys Val Arg Thr Asn Ala
 2885 2890 2895
 Ala Met Gly Ala Val Phe Thr Glu Glu Asn Gln Trp Asp Ser Ala Arg
 2900 2905 2910
 Ala Ala Val Glu Asp Glu Glu Phe Trp Lys Leu Val Asp Arg Glu Arg
 2915 2920 2925
 Glu Leu His Lys Leu Gly Lys Cys Gly Ser Cys Val Tyr Asn Met Met
 2930 2935 2940
 Gly Lys Arg Glu Lys Lys Leu Gly Glu Phe Gly Lys Ala Lys Gly Ser
 2945 2950 2955 2960
 Arg Ala Ile Trp Tyr Met Trp Leu Gly Ala Arg Tyr Leu Glu Phe Glu
 2965 2970 2975
 Ala Leu Gly Phe Leu Asn Glu Asp His Trp Phe Ser Arg Glu Asn Ser
 2980 2985 2990
 Tyr Ser Gly Val Glu Gly Glu Gly Leu His Lys Leu Gly Tyr Ile Leu
 2995 3000 3005
 Arg Asp Ile Ser Lys Ile Pro Gly Gly Ala Met Tyr Ala Asp Asp Thr
 3010 3015 3020
 Ala Gly Trp Asp Thr Arg Ile Thr Glu Asp Asp Leu His Asn Glu Glu
 3025 3030 3035 3040
 Lys Ile Thr Gln Gln Met Asp Pro Glu His Arg Gln Leu Ala Asn Ala
 3045 3050 3055
 Ile Phe Lys Leu Thr Tyr Gln Asn Lys Val Val Lys Val Gln Arg Pro
 3060 3065 3070
 Thr Pro Lys Gly Thr Val Met Asp Ile Ile Ser Arg Lys Asp Gln Arg
 3075 3080 3085
 Gly Ser Gly Gln Val Gly Thr Tyr Gly Leu Asn Thr Phe Thr Asn Met
 3090 3095 3100
 Glu Ala Gln Leu Ile Arg Gln Met Glu Gly Glu Gly Val Leu Ser Lys
 3105 3110 3115 3120
 Ala Asp Leu Glu Asn Pro His Leu Leu Glu Lys Lys Val Thr Gln Trp
 3125 3130 3135
 Leu Glu Thr Lys Gly Val Glu Arg Leu Lys Arg Met Ala Ile Ser Gly
 3140 3145 3150
 Asp Asp Cys Val Val Lys Pro Ile Asp Asp Arg Phe Ala Asn Ala Leu
 3155 3160 3165
 Leu Ala Leu Asn Asp Met Gly Lys Val Arg Lys Asp Ile Pro Gln Trp
 3170 3175 3180
 Gln Pro Ser Lys Gly Trp His Asp Trp Gln Gln Val Pro Phe Cys Ser
 3185 3190 3195 3200
 His His Phe His Glu Leu Ile Met Lys Asp Gly Arg Lys Leu Val Val
 3205 3210 3215
 Pro Cys Arg Pro Gln Asp Glu Leu Ile Gly Arg Ala Arg Ile Ser Gln
 3220 3225 3230
 Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Glu Thr Ala Cys Leu Gly Lys Ala Tyr
 3235 3240 3245
 Ala Gln Met Trp Thr Leu Met Tyr Phe His Arg Arg Asp Leu Arg Leu
 3250 3255 3260
 Ala Ser Asn Ala Ile Cys Ser Ala Val Pro Val His Trp Val Pro Thr
 3265 3270 3275 3280
 Ser Arg Thr Thr Trp Ser Ile His Ala His His Gln Trp Met Thr Thr
 3285 3290 3295
 Glu Asp Met Leu Thr Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Glu Asp Asn Pro
 3300 3305 3310
 Trp Met Glu Asp Lys Thr Pro Val Lys Thr Trp Glu Asp Val Pro Tyr

ES 2 677 348 T3

| | | | | | |
|-----|---|---------------------|------|------|------|
| | 3315 | | 3320 | | 3325 |
| Leu | Gly Lys Arg Glu Asp Gln Trp Cys Gly Ser | Leu Ile Gly Leu Thr | | | |
| | 3330 | | 3335 | | 3340 |
| Ser | Arg Ala Thr Trp Ala Gln Asn Ile Leu Thr | Ala Ile Gln Gln Val | | | |
| | 3345 | | 3350 | | 3355 |
| Arg | Ser Leu Ile Gly Asn Glu Glu Phe Leu Asp Tyr Met | Pro Ser Met | | | 3360 |
| | | 3365 | | 3370 | 3375 |
| Lys | Arg Phe Arg Lys Glu Glu Glu Ser Glu Gly Ala Ile | Trp | | | |
| | | 3380 | | 3385 | 3390 |

<210> 50
 <211> 2426
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región química CME del dengue 1

10 <400> 50

```

agttgtagt ctgtgtggac cgacaaggac agttccaaat cggaagcttg cttaacacag 60
ttctaacagt ttgtttgaat agagagcaga tctctggaaa aatgaacaac caacggaaaa 120
agacgggtcg accgtctttc aatatgctga aacgcgcgag aaaccgcgtg tcaactgggt 180
cacagttggc gaagagattc tcaaaaggat tgctttcagg ccaaggacct atgaaattgg 240
tgatggcttt catagcattt ctaagatttc tagccatacc cccaacagca ggaattttgg 300
ctagatggag ctcaattcaag aagaatggag cgatcaaagt gttacgggggt ttcaaaaaag 360
agatctcaag catggtgaac attatgaaca ggaggaaaaa atctgtgacc atgctcctca 420
tgctgctgoc cacagccctg gcgttccatt tgaccacacg agggggagag ccacacatga 480
tagttagtaa gcaggaaaga ggaaagtca cgttgtttta gacctctgca ggcatcaata 540
tgtgcaactc cattgogatg gatttgggag agttatgcga ggacacaatg acctacaaat 600
gccccggat cactgaggcg gaaccagatg acgttgactg ctggtgcaat gccacagaca 660
catgggtgac ctatgggacg tgttctcaaa cggcgcaaca ccgacgagac aaacggtccg 720
tggcactggc cccacacgtg ggacttggtc tagaaacaag aaccgaaaca tggatgtcct 780
ctgaaggtgc ctggaaaaca gtacaaaaag tggagacttg ggctttgaga caccaggat 840
tcacgggtgac agcccttttt ttagcacatg ccataggaac atccattact cagaaaggga 900
tcattttcat tctgctgatg ctagtaacac catcaatggc catgogatgt gtgggaatag 960
gcaacagaga cttogttgaa ggactgtcag gagcaacgtg ggtggacgtg gtattggagc 1020
atggaagctg cgtcaccacc atggcaaaaag ataaaccaac attggacatt gaactcttga 1080
agacggaggt cacaaaacct gccgtcttgc gcaaacgtg cattgaaagt aaaatatcaa 1140
acaccaccac cgattcaagg tgtccaacac aaggagaggc tacactggtg gaagaacagg 1200
actcgaactt tgtgtgtoga cgaacgtttg tggacagagg ctggggtaat ggctgcggac 1260
tatttggaaa aggaagccta ctgacgtgtg ctaagttcaa gtgtgtgaca aaactagaag 1320
gaaagatagt tcaatatgaa aacttaaaat attcagtgat agtcaactgt cacactgggg 1380
accagacca ggtgggaaac gagactacag aacatggaac aattgcaacc ataacacctc 1440
aagctectac gtcggaaata cagctgactg actacggagc cctcacattg gactgctcgc 1500
ctagaacagg gctggacttt aatgagatgg ttctattgac aatgaaagaa aaatcatggc 1560
ttgtccaaa acaatggttt ctagacttac cactgccttg gacttcagga gcttcaacat 1620
ctcaagagac ttggaacaga caagatttgc tggtcacatt caagacagct catgcaaaga 1680
aacaggaagt agtcgtactg ggatcacagg aaggagcaat gcacactgoc ttgactgggg 1740
cgacagaaat ccagacgtca ggaacgacaa caatctttgc aggacacctg aaatgcagac 1800
taaaaatgga taaactgact ttaaaagggg tgatcatatgt aatgtgcaca ggctcattta 1860
agctagagaa ggaagtggct gagaccocagc atggaactgt tttagtgcag gttaaatagc 1920
aaggaacaga tgcgccatgc aagatccctt tttcggccca agatgagaaa ggagtgacct 1980
agaatgggag attgataaca gccaaaccca tagtcaactga caaagaaaaa ccagtcaaca 2040
ttgagacaga accacctttt ggtgagagct acatcgtggt aggggcagggt gaaaaagctt 2100
    
```

ES 2 677 348 T3

```

tgaaactgag ctgggttcaag aaagggagca gcatagggaa aatgttcgaa gcaactgccc 2160
gaggagcgcg aaggatggct atcctgggag acacegcatg ggactttggc tctataggag 2220
gagtggtcac atcagtggga aaattggtac accaggtttt tggagccgca tatgggggttc 2280
tgttcagcgg tgtttcttgg accatgaaaa taggaatagg gattctgctg acatggctag 2340
gattaaactc gaggaacact tcaatggcta tgacgtgcat agctgttggg ggaatcactc 2400
tgtttctggg cttcacagtt caagca 2426
    
```

<210> 51
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Región quimérica de CME del dengue 1

10

<400> 51

```

Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys Thr Gly Arg Pro Ser Phe Asn Met Leu
 1                    5                    10                    15
Lys Arg Ala Arg Asn Arg Val Ser Thr Gly Ser Gln Leu Ala Lys Arg
      20                    25                    30
Phe Ser Lys Gly Leu Leu Ser Gly Gln Gly Pro Met Lys Leu Val Met
      35                    40                    45
Ala Phe Ile Ala Phe Leu Arg Phe Leu Ala Ile Pro Pro Thr Ala Gly
      50                    55                    60
Ile Leu Ala Arg Trp Ser Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Ile Lys Val
      65                    70                    75                    80
Leu Arg Gly Phe Lys Lys Glu Ile Ser Ser Met Leu Asn Ile Met Asn
      85                    90                    95
Arg Arg Lys Lys Ser Val Thr Met Leu Leu Met Leu Leu Pro Thr Ala
      100                    105                    110
Leu Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Gly Gly Glu Pro His Met Ile Val
      115                    120                    125
Ser Lys Gln Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ser Ala Gly
      130                    135                    140
Ile Asn Met Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu
      145                    150                    155                    160
Asp Thr Met Thr Tyr Lys Cys Pro Arg Ile Thr Glu Ala Glu Pro Asp
      165                    170                    175
Asp Val Asp Cys Trp Cys Asn Ala Thr Asp Thr Trp Val Thr Tyr Gly
      180                    185                    190
Thr Cys Ser Gln Thr Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala
      195                    200                    205
Leu Ala Pro His Val Gly Leu Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp
      210                    215                    220
Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys Gln Val Gln Lys Val Glu Thr Trp
      225                    230                    235                    240
Ala Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Val Thr Ala Leu Phe Leu Ala His
      245                    250                    255
Ala Ile Gly Thr Ser Ile Thr Gln Lys Gly Ile Ile Phe Ile Leu Leu
      260                    265                    270
Met Leu Val Thr Pro Ser Met Ala Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn
      275                    280                    285
Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val
      290                    295                    300
Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr
    
```

ES 2 677 348 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | 320 | |
| Leu | Asp | Ile | Glu | Leu | Leu | Lys | Thr | Glu | Val | Thr | Asn | Pro | Ala | Val | Leu |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Arg | Lys | Leu | Cys | Ile | Glu | Ala | Lys | Ile | Ser | Asn | Thr | Thr | Thr | Asp | Ser |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | | 350 | |
| Arg | Cys | Pro | Thr | Gln | Gly | Glu | Ala | Thr | Leu | Val | Glu | Glu | Gln | Asp | Ser |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | | 365 | | |
| Asn | Phe | Val | Cys | Arg | Arg | Thr | Phe | Val | Asp | Arg | Gly | Trp | Gly | Asn | Gly |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Cys | Gly | Leu | Phe | Gly | Lys | Gly | Ser | Leu | Leu | Thr | Cys | Ala | Lys | Phe | Lys |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Cys | Val | Thr | Lys | Leu | Glu | Gly | Lys | Ile | Val | Gln | Tyr | Glu | Asn | Leu | Lys |
| | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Tyr | Ser | Val | Ile | Val | Thr | Val | His | Thr | Gly | Asp | Gln | His | Gln | Val | Gly |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Asn | Glu | Thr | Thr | Glu | His | Gly | Thr | Ile | Ala | Thr | Ile | Thr | Pro | Gln | Ala |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | | 445 | | |
| Pro | Thr | Ser | Glu | Ile | Gln | Leu | Thr | Asp | Tyr | Gly | Ala | Leu | Thr | Leu | Asp |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| Cys | Ser | Pro | Arg | Thr | Gly | Leu | Asp | Phe | Asn | Glu | Met | Val | Leu | Leu | Thr |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| Met | Lys | Glu | Lys | Ser | Trp | Leu | Val | His | Lys | Gln | Trp | Phe | Leu | Asp | Leu |
| | | | 485 | | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| Pro | Leu | Pro | Trp | Thr | Ser | Gly | Ala | Ser | Thr | Ser | Gln | Glu | Thr | Trp | Asn |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | | 510 | |
| Arg | Gln | Asp | Leu | Leu | Val | Thr | Phe | Lys | Thr | Ala | His | Ala | Lys | Lys | Gln |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | | 525 | | |
| Glu | Val | Val | Val | Leu | Gly | Ser | Gln | Glu | Gly | Ala | Met | His | Thr | Ala | Leu |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| Thr | Gly | Ala | Thr | Glu | Ile | Gln | Thr | Ser | Gly | Thr | Thr | Thr | Ile | Phe | Ala |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| Gly | His | Leu | Lys | Cys | Arg | Leu | Lys | Met | Asp | Lys | Leu | Thr | Leu | Lys | Gly |
| | | | 565 | | | | | | 570 | | | | | 575 | |
| Met | Ser | Tyr | Val | Met | Cys | Thr | Gly | Ser | Phe | Lys | Leu | Glu | Lys | Glu | Val |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | | 590 | |
| Ala | Glu | Thr | Gln | His | Gly | Thr | Val | Leu | Val | Gln | Val | Lys | Tyr | Glu | Gly |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | | | 605 | |
| Thr | Asp | Ala | Pro | Cys | Lys | Ile | Pro | Phe | Ser | Ala | Gln | Asp | Glu | Lys | Gly |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | | 620 | | | |
| Val | Thr | Gln | Asn | Gly | Arg | Leu | Ile | Thr | Ala | Asn | Pro | Ile | Val | Thr | Asp |
| 625 | | | | | 630 | | | | | | 635 | | | | 640 |
| Lys | Glu | Lys | Pro | Val | Asn | Ile | Glu | Thr | Glu | Pro | Pro | Phe | Gly | Glu | Ser |
| | | | 645 | | | | | | | 650 | | | | 655 | |
| Tyr | Ile | Val | Val | Gly | Ala | Gly | Glu | Lys | Ala | Leu | Lys | Leu | Ser | Trp | Phe |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | | 670 | |
| Lys | Lys | Gly | Ser | Ser | Ile | Gly | Lys | Met | Phe | Glu | Ala | Thr | Ala | Arg | Gly |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | | 685 | | |
| Ala | Arg | Arg | Met | Ala | Ile | Leu | Gly | Asp | Thr | Ala | Trp | Asp | Phe | Gly | Ser |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | |
| Ile | Gly | Gly | Val | Phe | Thr | Ser | Val | Gly | Lys | Leu | Val | His | Gln | Val | Phe |
| 705 | | | | | 710 | | | | | | 715 | | | | 720 |
| Gly | Ala | Ala | Tyr | Gly | Val | Leu | Phe | Ser | Gly | Val | Ser | Trp | Thr | Met | Lys |
| | | | 725 | | | | | | 730 | | | | | 735 | |
| Ile | Gly | Ile | Gly | Ile | Leu | Leu | Thr | Trp | Leu | Gly | Leu | Asn | Ser | Arg | Asn |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | | 750 | |

Thr Ser Met Ala Met Thr Cys Ile Ala Val Gly Gly Ile Thr Leu Phe
 755 760 765
 Leu Gly Phe Thr Val Gln Ala
 770 775

- <210> 52
- <211> 2423
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Región quimérica ME del dengue 1
- <400> 52

```

agttgttagt ctgtgtggac cgacaaggac agttccaaat cggagccttg cttaacacag 60
ttctaacagt ttgtttgaat agagagcaga tctctggaaa aatgaaccaa cgaaaaaagg 120
tggtagacc acctttcaat atgctgaaac gcgagagaaa ccgctatca acccctcaag 180
ggttggtgaa gagattotca accggacttt tttctgggaa aggaccotta cggatggtgc 240
tagcattcat cacgtttttg cgagtccttt ccatcccacc aacagcaggg attctgaaga 300
gatggggaca gttgaagaaa aataaggcca tcaagatact gattggattc aggaaggaga 360
taggcgcgat gctgaacate ttgaacggga gaaaaaggte tgcagccatg ctctcatgc 420
tgctgcccac agccctggcg ttccatttga ccacacgagg gggagagcca cacatgatag 480
ttagtaagca ggaaagagga aagtcactgt tgtttaagac ctctgcaggg atcaatatgt 540
gcactotcat tgcgatggat ttgggagagt tatgcgagga cacaatgacc tacaatgccc 600
cccgatcac tgaggcggaa ccagatgacg ttgactgctg gtgcaatgcc acagacacat 660
gggtgaccta tgggacgtgt tctcaaaccg gogaacaccg acgagacaaa cgttccgtgg 720
cactggcccc acacgtggga cttggtctag aaacaagaac cgaaacatgg atgtcctctg 780
aaggtgocgt gaaacaagta caaaaagtgg agacttgggc tttgagacac ccaggattca 840
cggtgacagc cttttttta gcacatgcca taggaacatc cattaactcag aaagggatca 900
ttttcattct gctgatgcta gtaacaccat caatggccat gcgatgtgtg ggaataggca 960
acagagactt cgttgaagga ctgtcaggag caacgtgggt ggacgtggtt ttggagcatg 1020
gaagctgcgt caccaccatg gcaaaagata aaccaacatt ggacattgaa ctcttgaaga 1080
cggaggtcac aaacccctgcc gtcttgccga aactgtgcat tgaagctaaa atatcaaaaa 1140
ccaccaccga ttcaaggtgt ccaacacaag gagaggctac actggtggaa gaacaggact 1200
cgaactttgt gtgtcgacga acgtttgtgg acagagcctg gggtaatggc tgcggactat 1260
ttggaaaagg aagcctactg acgtgtgcta agttoaagtg tgtgacaaaa ctagaaggaa 1320
agatagttca atatgaaaac ttaaaatatt cagtgatagt cactgtccac actggggacc 1380
agcaccaggt gggaaacgag actacagaac atggaacaat tgaaccata acacctcaag 1440
ctcctacgtc ggaaatacag ctgactgaat accggagccct cacattggac tgctcgccca 1500
gaacagggct ggactttaat gagatggttc battgacaat gaaagaaaaa tcatggcttg 1560
tcacaaaaca atggtttcta gacttaccac tgocctggac ttcaggagct tcaacatctc 1620
aagagacttg gaacagacaa gatttgcctg tcacattcaa gacagctcat gcaaaagaaac 1680
aggaagtagt cgtactggga tcacaggaag gagcaatgca cactgccttg actggggcga 1740
cagaaatcca gacgtcagga acgacaacaa totttgcagg acacctgaaa tgcagactaa 1800
aaatggataa actgacttta aaagggatgt catatgtaat gtgcacagggc tcatttaagc 1860
tagagaagga agtggctgag acccagcatg gaactgtttt agtgcaggtt aaatacgaag 1920
gaacagatgc gccatgcaag atcccttttt cggcccaaga tgagaaagga gtgaccoga 1980
atgggagatt gataacagcc aaccccatag tcaactgaca agaaaaacca gtcaacattg 2040
agacagaacc accttttggg gagagctaca togtggtagg ggcaggtgaa aaagctttga 2100
aactgagctg gttcaagaaa gggagcagca tagggaaaat gttcgaagca actgcccag 2160
gagcgcgaag gatggctatc ctgggagaca ccgcatggga ctttggctct ataggaggag 2220
tgttcacatc agtgggaaaa ttgggtacacc aggttttttg agccgcatat ggggttctgt 2280
tcagcgtgtt ttcttgacc atgaaaatag gaatagggat tctgctgaca tggctaggat 2340
taaactcgag gaacacttca atggctatga cgtgcatagc tgttggagga atcactctgt 2400
ttctgggctt cacagttcaa gca 2423
    
```

ES 2 677 348 T3

<210> 53
 <211> 774
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Región quimérica ME del dengue 1

<400> 53

10

```

Met Asn Gln Arg Lys Lys Val Val Arg Pro Pro Phe Asn Met Leu Lys
 1          5          10          15
Arg Glu Arg Asn Arg Val Ser Thr Pro Gln Gly Leu Val Lys Arg Phe
 20          25          30
Ser Thr Gly Leu Phe Ser Gly Lys Gly Pro Leu Arg Met Val Leu Ala
 35          40          45
Phe Ile Thr Phe Leu Arg Val Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile
 50          55          60
Leu Lys Arg Trp Gly Gln Leu Lys Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ile Leu
 65          70          75          80
Ile Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn Gly
 85          90          95
Arg Lys Arg Ser Ala Ala Met Leu Leu Met Leu Leu Pro Thr Ala Leu
 100         105         110
Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Gly Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser
 115         120         125
Lys Gln Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ser Ala Gly Ile
 130         135         140
Asn Met Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp
 145         150         155         160
Thr Met Thr Tyr Lys Cys Pro Arg Ile Thr Glu Ala Glu Pro Asp Asp
 165         170         175
Val Asp Cys Trp Cys Asn Ala Thr Asp Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr
 180         185         190
Cys Ser Gln Thr Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala Leu
 195         200         205
Ala Pro His Val Gly Leu Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met
 210         215         220
Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys Gln Val Gln Lys Val Glu Thr Trp Ala
 225         230         235         240
Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Val Thr Ala Leu Phe Leu Ala His Ala
 245         250         255
Ile Gly Thr Ser Ile Thr Gln Lys Gly Ile Ile Phe Ile Leu Leu Met
 260         265         270
Leu Val Thr Pro Ser Met Ala Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg
 275         280         285
Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu
 290         295         300
Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu
 305         310         315         320
Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg
 325         330         335
Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg
 340         345         350
    
```

Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ser Asn
 355 360 365
 Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys
 370 375 380
 Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Leu Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys
 385 390 395 400
 Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr
 405 410 415
 Ser Val Ile Val Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn
 420 425 430
 Glu Thr Thr Glu His Gly Thr Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro
 435 440 445
 Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys
 450 455 460
 Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met
 465 470 475 480
 Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro
 485 490 495
 Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg
 500 505 510
 Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu
 515 520 525
 Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr
 530 535 540
 Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly
 545 550 555 560
 His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met
 565 570 575
 Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala
 580 585 590
 Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr
 595 600 605
 Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Ala Gln Asp Glu Lys Gly Val
 610 615 620
 Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys
 625 630 635 640
 Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr
 645 650 655
 Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys
 660 665 670
 Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala
 675 680 685
 Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile
 690 695 700
 Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Leu Val His Gln Val Phe Gly
 705 710 715 720
 Ala Ala Tyr Gly Val Leu Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile
 725 730 735
 Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Asn Thr
 740 745 750
 Ser Met Ala Met Thr Cys Ile Ala Val Gly Gly Ile Thr Leu Phe Leu
 755 760 765
 Gly Phe Thr Val Gln Ala
 770

REIVINDICACIONES

1. Un virus del dengue quimérico recombinante que comprende una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica la proteína estructural C del virus del dengue tipo 4 y las proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 1, del virus del dengue de tipo 2 o del virus del dengue de tipo 3, en donde la región del virus del dengue de tipo 4 que codifica las proteínas estructurales M y E se sustituye por la región que codifica dichas proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 1, del virus del dengue de tipo 2 o del virus del dengue de tipo 3, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales del virus del dengue de tipo 4 y la región no traducida en 3' del genoma del dengue de tipo 4 que contiene una delección de 30 nucleótidos que se corresponde con la estructura de tallo-bucle de TL2 entre los nucleótidos 10478-10507 del genoma del dengue de tipo 4.
2. El virus del dengue quimérico recombinante de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una mutación que confiere un fenotipo en donde el fenotipo es sensible a la temperatura en células *Vero* o en la línea celular de hígado humano HuH-7, restricción del hospedador celular en células de mosquito o en la línea celular de hígado humano HuH-7, adaptación de célula hospedadora para una replicación mejorada en células *Vero* o atenuación en ratones o monos.
3. El virus del dengue quimérico recombinante de la reivindicación 1 o 2 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora.
4. El virus del dengue quimérico recombinante para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho virus del dengue quimérico recombinante está comprendido en una vacuna para su administración a un sujeto en una cantidad eficaz.
5. El virus del dengue recombinante quimérico de la reivindicación 1 o 2 para su uso en la prevención de una enfermedad causada por el virus del dengue.
6. El virus del dengue quimérico recombinante para su uso en la prevención de una enfermedad causada por el virus del dengue de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho virus del dengue quimérico recombinante está comprendido en una vacuna para su administración a un sujeto en una cantidad eficaz.
7. Una vacuna o composición inmunogénica que comprende al menos un virus del dengue quimérico recombinante de la reivindicación 1 o 2.
8. La vacuna o la composición inmunogénica de la reivindicación 7 que es una vacuna del virus del dengue o una composición inmunogénica del virus del dengue.
9. La vacuna o la composición inmunogénica de la reivindicación 7 u 8 que es una vacuna tetravalente o una composición inmunogénica tetravalente.
10. La vacuna o composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que comprende rDEN1/4Δ30 (ME), rDEN2/4Δ30 (ME) y rDEN3/4Δ30 (ME), en donde:
 rDEN1/4Δ30 (ME) es un virus del dengue quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica la proteína estructural C del virus del dengue de tipo 4 y las proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 1, en donde la región del virus del dengue de tipo 4 que codifica las proteínas estructurales M y E se sustituye por la región que codifica dichas proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 1, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales del virus del dengue de tipo 4, y la región no traducida en 3' del genoma del dengue de tipo 4 que contiene dicha delección de 30 nucleótidos;
 rDEN2/4Δ30 (ME) es un virus del dengue quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica la proteína estructural C del virus del dengue de tipo 4 y las proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 2, en donde la región del virus del dengue de tipo 4 que codifica las proteínas estructurales M y E se sustituye por la región que codifica dichas proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 2, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales del virus del dengue de tipo 4, y la región no traducida en 3' del genoma del dengue de tipo 4 que contiene dicha delección de 30 nucleótidos; y
 rDEN3/4Δ30 (ME) es un virus del dengue quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica la proteína estructural C del virus del dengue de tipo 4 y las proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 3, en donde la región del virus del dengue de tipo 4 que codifica las proteínas estructurales M y E se sustituye por la región que codifica dichas proteínas estructurales M y E del virus del dengue de tipo 3, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales del virus del dengue de tipo 4, y la región no traducida en 3' del genoma del dengue de tipo 4 que contiene dicha delección de 30 nucleótidos.
11. El virus del dengue quimérico recombinante para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora

de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que se administra a un sujeto humano.

12. El virus del dengue recombinante quimérico para su uso en la prevención de una enfermedad causada por el virus del dengue de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, que se administra a un sujeto humano.

5

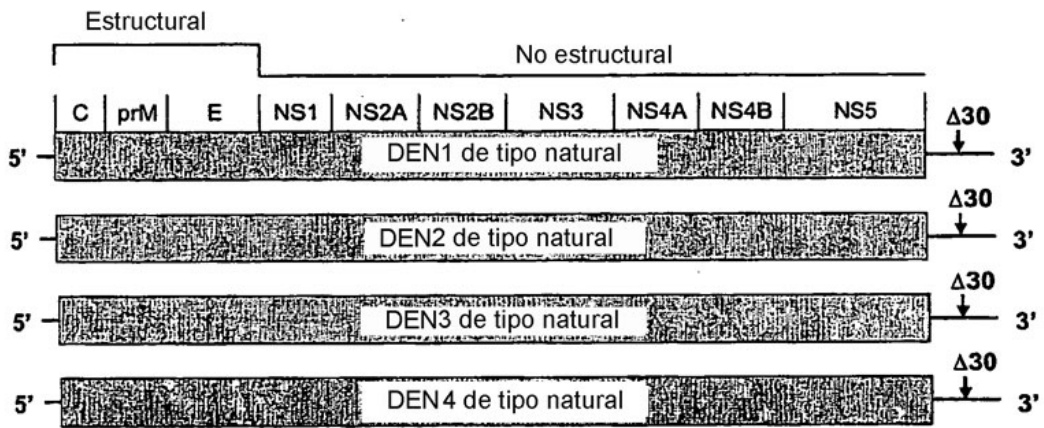
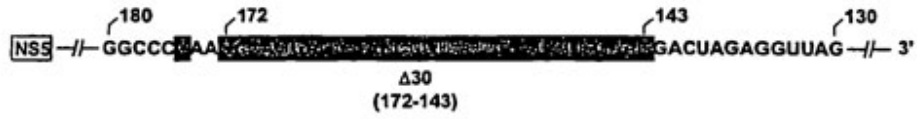


Figura 1

A.



B.

DEN1 GGGGCC - AACACCAGGGGAAGCUGUACCCUGGUGUAAGGACUAGA
 DEN1Δ30 GGGGCC - AA-----GACUAGA
 DEN2 GGGGCC - AAGGUGAGAUGAAGCUGUAGUCACUGGAAGGACUAGA
 DEN2Δ30 GGGGCC - AA-----GACUAGA
 DEN3 GGGGCCGAGCUCUGAGGGAAGCUGUACCCUUGCAAAGGACUAGA
 DEN3Δ30 GGGGCCAA-----GACUAGA
 DEN4 GGGGCCGAAGCCAGGAGGAAGCUGUACCCUGGUGUAAGGACUAGA
 DEN4Δ30 GGGGCC - AA-----GACUAGA

DEN1 GGGGCC - AacaccagggGAAGCUGUaccucggugUAAGGACUAGA
 DEN2 GGGGCC - AaggugagauGAAGCUGUagucacugUAAGGACUAGA
 DEN3 GGGGCCGAgcucugagGAAGCUGUaccucugcaAAGGACUAGA
 DEN4 GGGGCCGAagccaggaGAAGCUGUaccucggugUAAGGACUAGA

C.

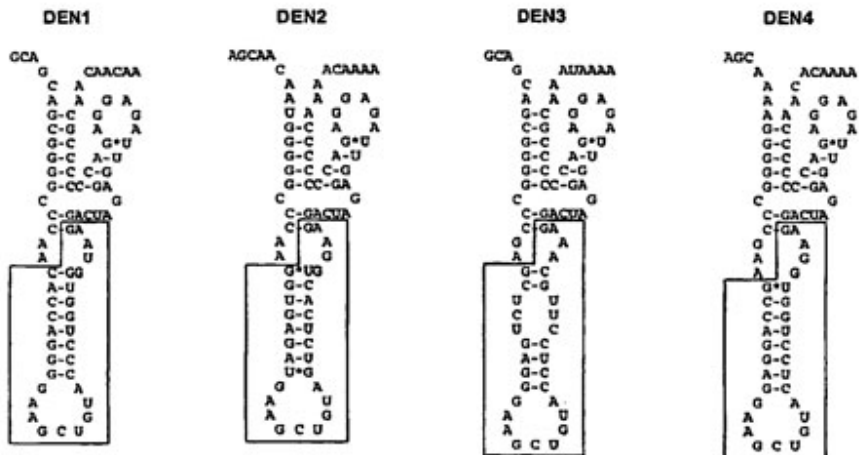


Figura 2

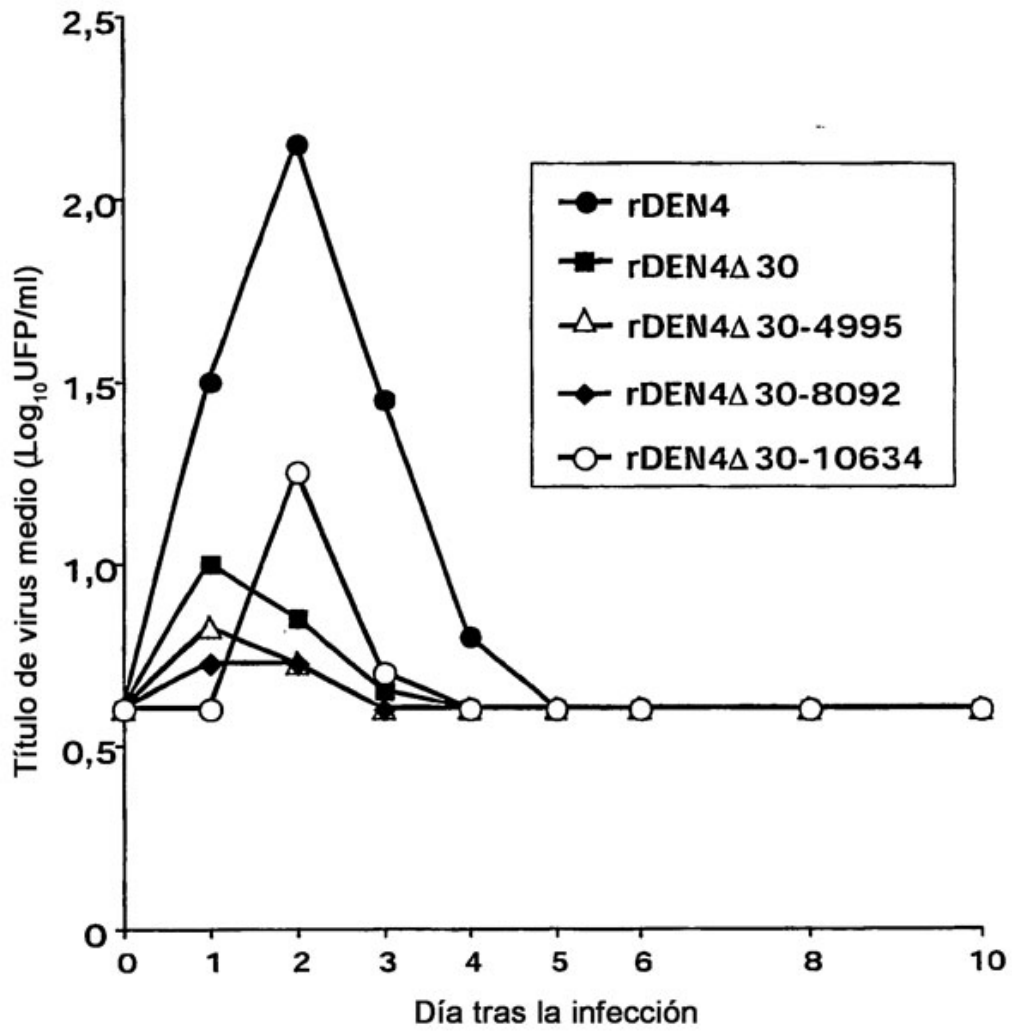


Figura 3

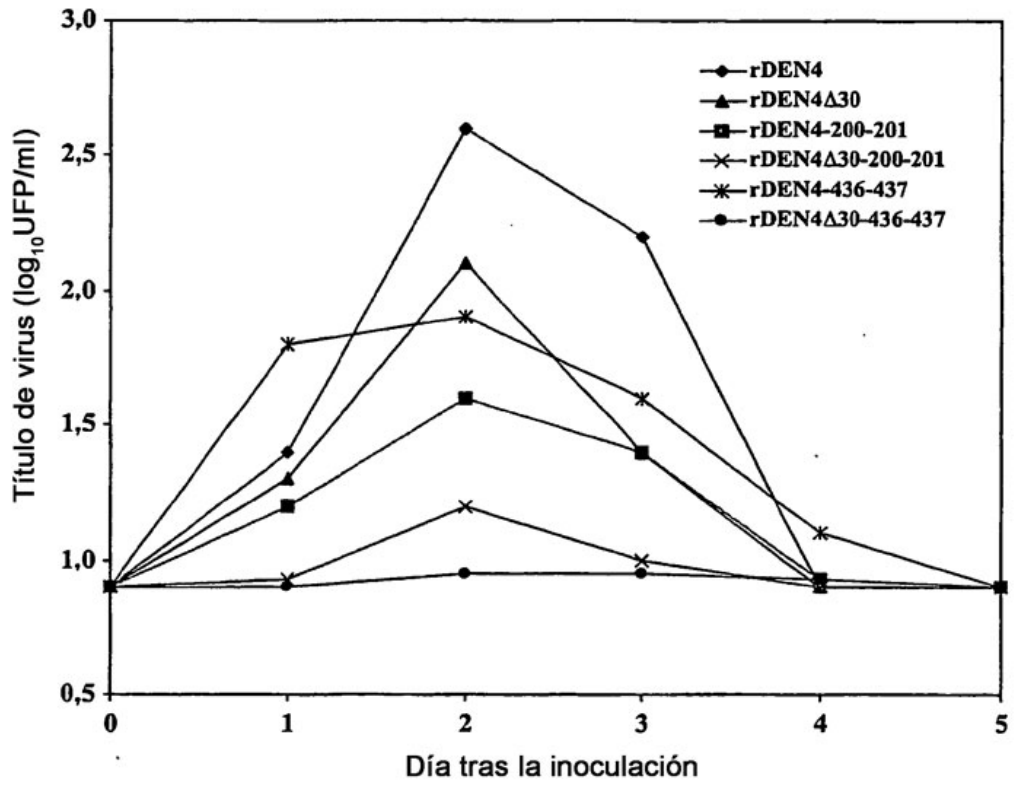


Figura 4

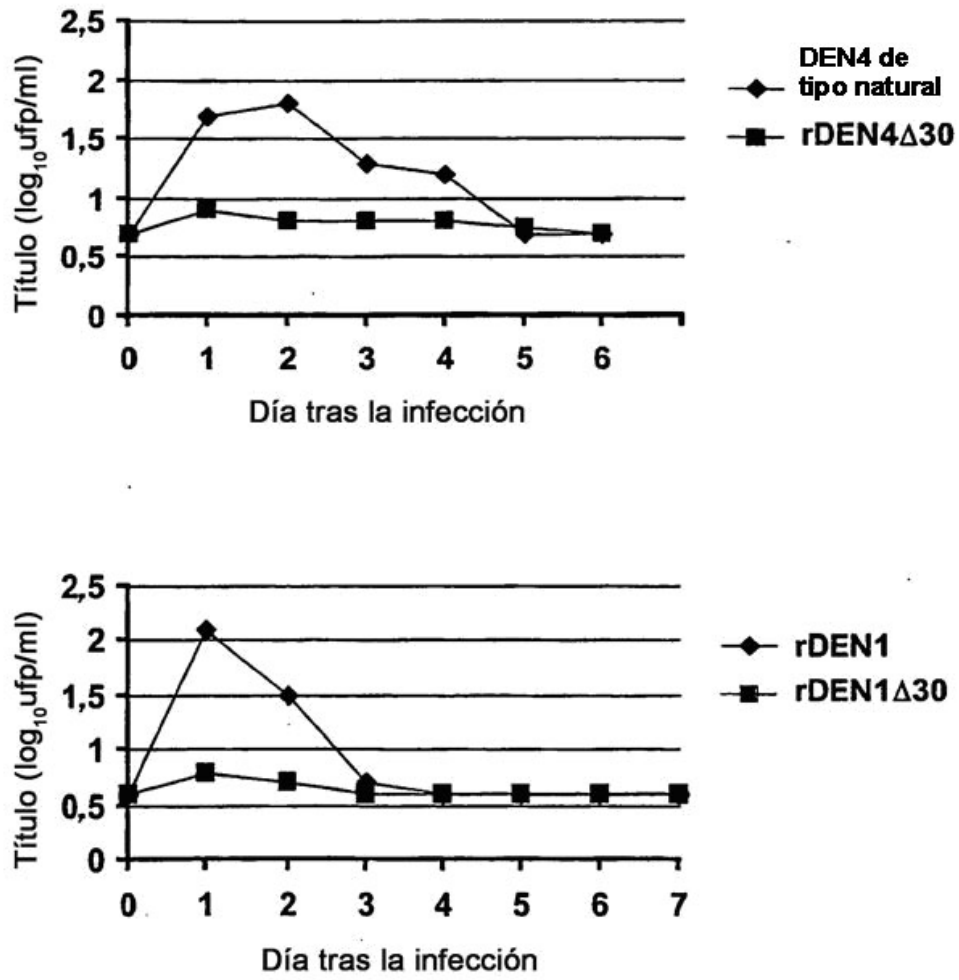


Figura 5

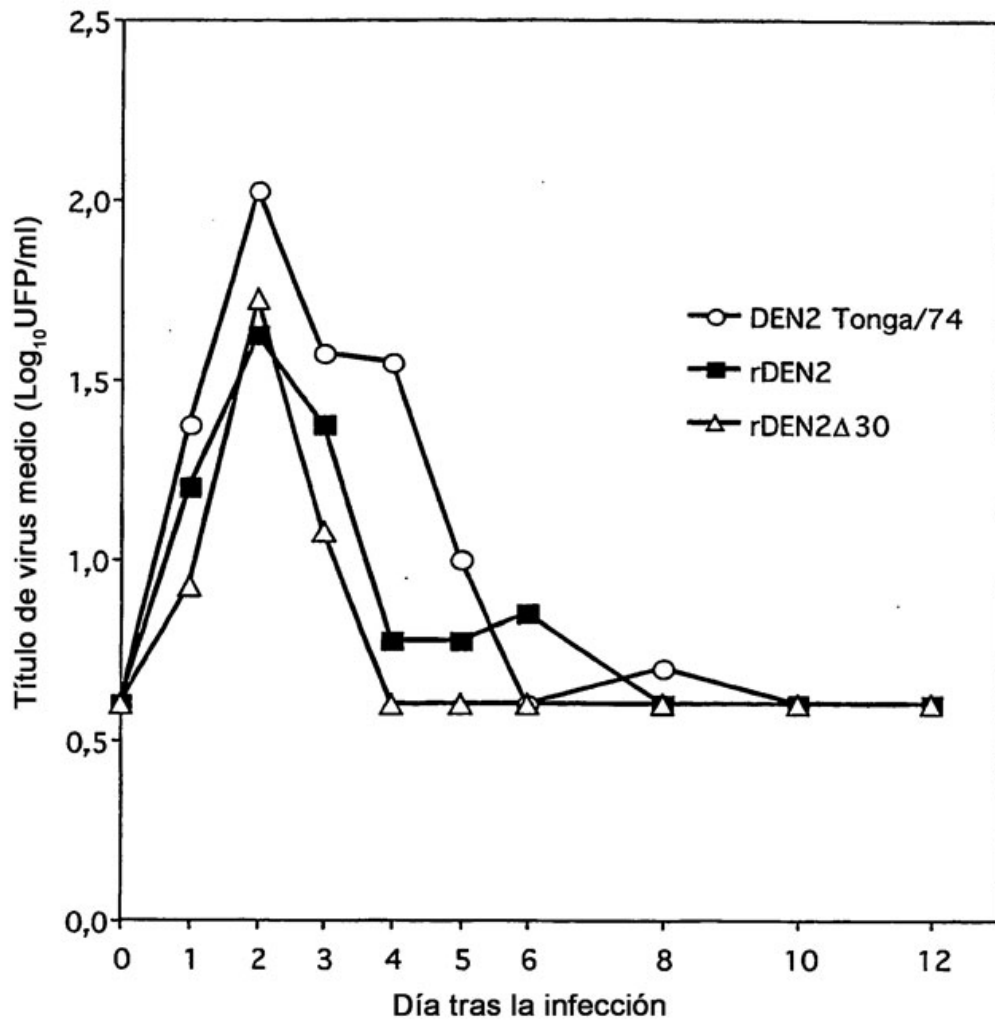
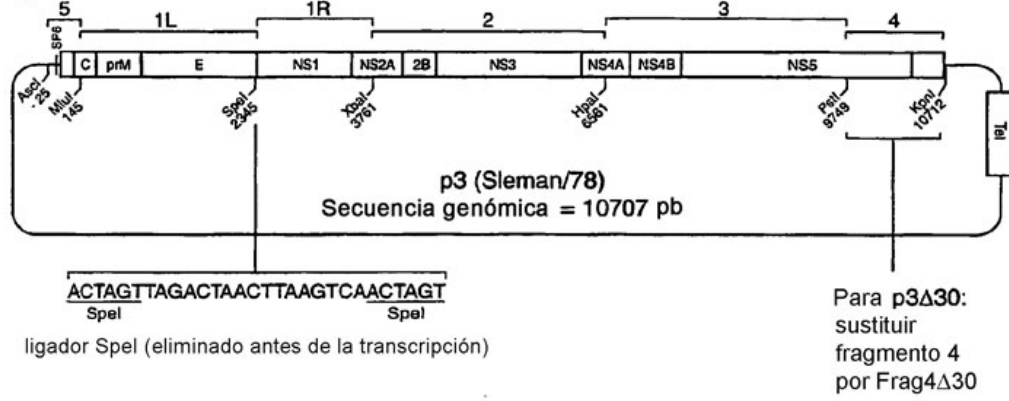


Figura 7

A.

Fragmentos subclonados:



B.

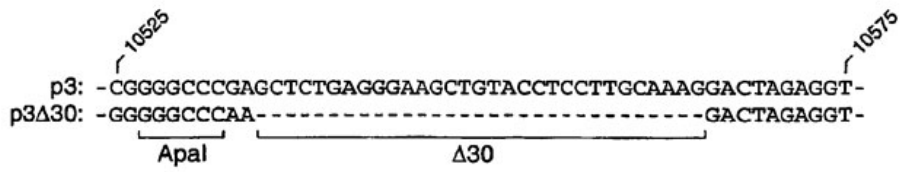


Figura 8

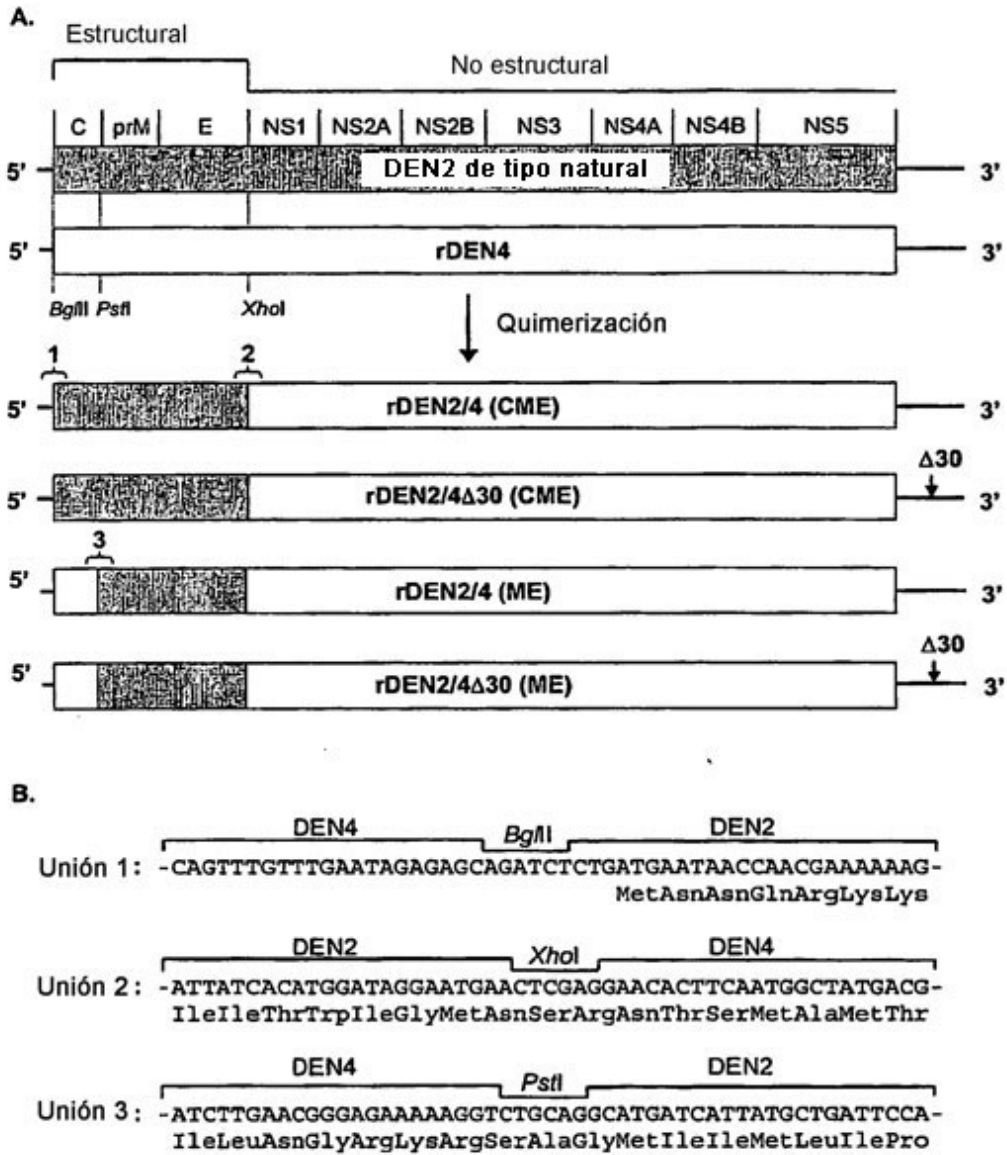


Figura 9

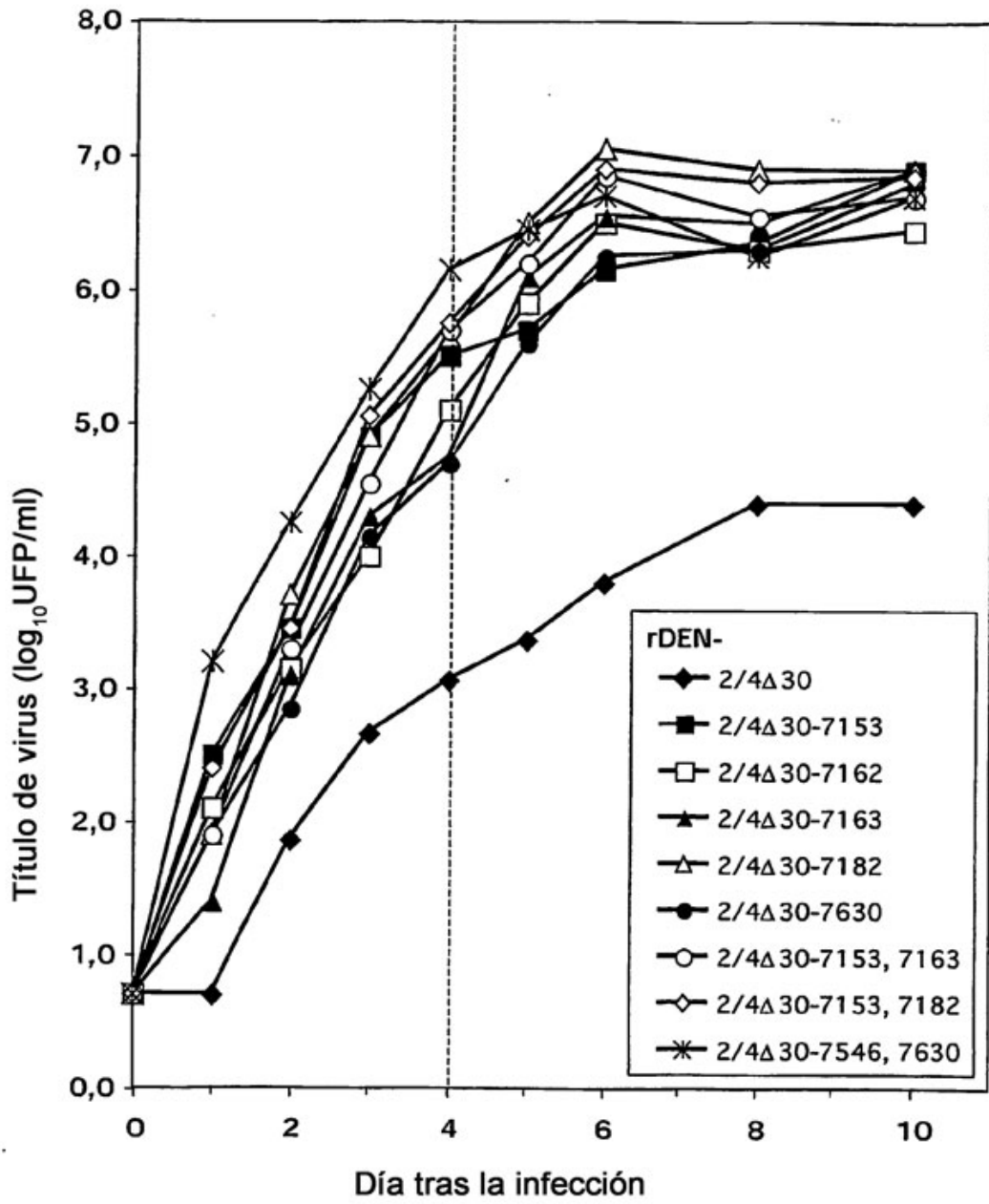


Figura 10

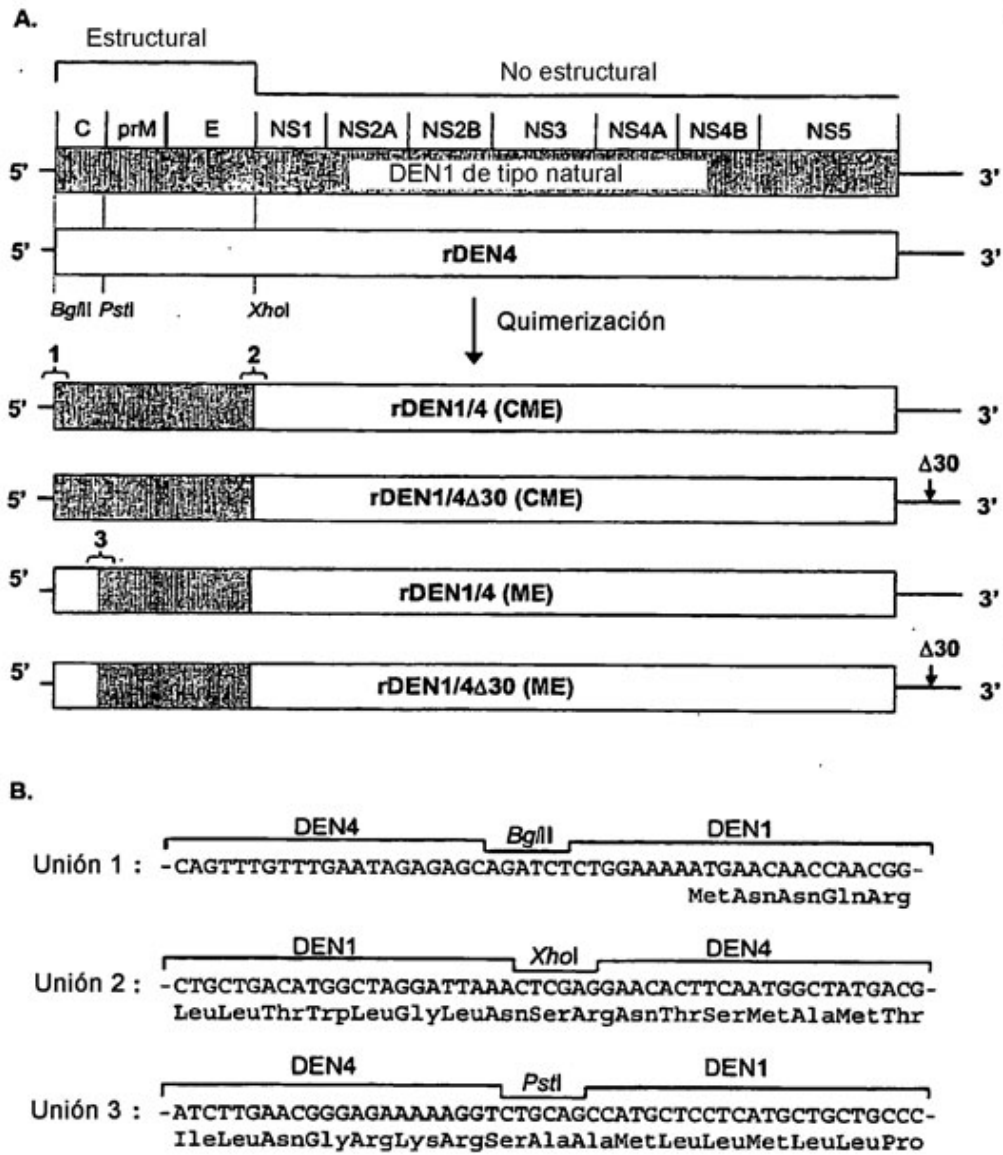


Figura 12