Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda
CSA836223

PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-74482 ½

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

TITULO: VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR ATENUADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE, COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO

SOLICITANTE: WYETH LLC

DIRECCIÓN: Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ Junio 21 de 2010

P2010/000095

21-07-2010

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-074482- -00000-0000
Fecha: 2010-06-21 17:10:53 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 443

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2010/000095**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**	**Nombre:** WYETH LLC **Dirección** Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 E.U.A. **Nacionalidad o Domicilio:** Estadounidense **Lugar de Constitución:** Estados Unidos **Teléfono:** _____ **Fax:** _____ **E-mail:** _____	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [ ] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Cual** _____ **Número** _____
REPRESENTANTE O APODERADO	**Nombre:** CARLOS R. OLARTE **Dirección:** World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10 **Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799 **E-mail:** office@olarteraisbeck.com	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [X] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Cual** _____ **Número** 79.782.747Bta **TP** 74.295
INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** VER PAGINA ADJUNTA **Dirección:** VER PAGINA ADJUNTA **Nacionalidad o Domicilio:** VER PAGINA ADJUNTA	

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/087375 Fecha Diciembre 18, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/082664 Fecha Julio 2, 2009

(6) **Título (54)** **VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR ATENUADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE, COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/205, C12N 7/08

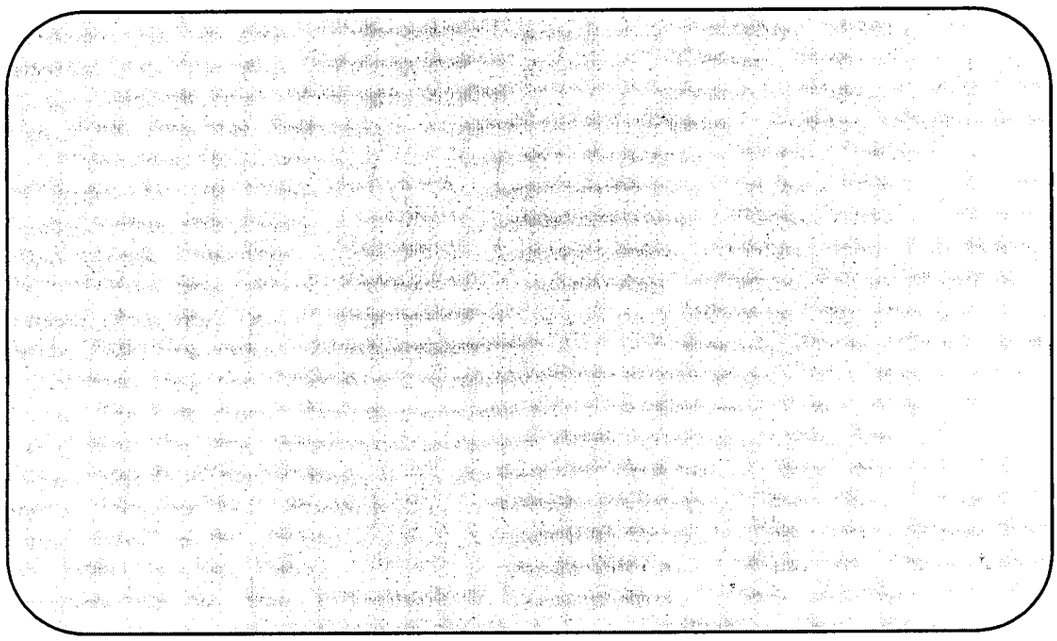
Prioridad SI [X] NO [ ]	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	Diciembre 21, 2007	61/015,868

(9) **Comprobante de pago No.** 10- **Fecha** Junio de 2010

(10) **ANEXOS**

X	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
X	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
X	Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver Expediente No. 10-030.400
	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
	Declaraciones.
X	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
X	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
	Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
	Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
	Arte final 12 x 12.
	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
	De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
X	Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**



( ) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES PCT/US2008/087375

NARENDER KUMAR KAYLAN
232 North Walnut Street,
Ridgewood, NJ 07450
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

IRINA YURGELONIS
719 Midwood Road,
Ridgewood, NJ 07450,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

ROGER MICHAEL HENDRY
384 Route 17a,
Warwick, NY 10990
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

MARK CUTLER
104 Natalie Court,
Bloomingdale, NJ 07403
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

KRISTEN ELISSA SYVERTSEN
12 Tappan Landing Road,
Unit 52b, Tarrytown, NY 10291
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 49,664
FECHA : JUNIO 21 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-074482- -00000-0000
Fecha: 2010-06-21 17:10:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 443

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	174889296	21/06/2010	7,859,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

7 700037 836803

ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

CINCO MIL CIENTO UNO (5101)

FECHA DE OTORGAMIENTO:

CUATRO (4) DE JUNIO DE DOS MIL DIEZ (2010)

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTA D.C.----------

CODIGO NOTARIAL 1100100038.----------

SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO.----------

FORMULARIO DE CALIFICACION.----------

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE DOCUMENTOS.----------

PERSONAS QUE INTERVIENEN: CARLOS REINALDO OLARTE, identificado con cedula de ciudadanía numero 79,782,747 expedida en Bogotá D.C.----------

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los CUATRO (04) días del mes de JUNIO de dos mil diez (2.010), ante mí EDUARDO DURAN GOMEZ. **NOTARIO TREINTA Y OCHO (38E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.**----------

Compareció con minuta escrita el señor **CARLOS REINALDO OLARTE,** mayor de edad, con domicilio y residencia en la ciudad de Bogotá, identificado con la cedula de ciudadanía número 79,782,747 de Bogotá D.C., de estado civil Casado, con sociedad conyugal vigente, quien manifestó su propósito de celebrar el acto que define las siguientes estipulaciones: ----------

PRIMERA.- Que presenta para su Protocolización los siguientes doçumentos:----

1º Traducción oficial de un documento que esta originalmente en ingles contenida en cuatro (4) folios utiles y es del siguiente tenor: ----------

PODER GENERAL.- WYETH LLC.- domiciliado en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America.- nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

administrativas, judiciales o de policia, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones, formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la presentación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestro interes.- Firma: Gregg C. Benson.- Fecha: 4 MAY 2010.- Ciudad, País: GROTON, CONNECTICUT USA.----------

CERTIFICACION NOTARIAL.- En esta fecha, May 6 2010.- el Notario Público suscrito certifica: ----------

1. Que GREGG C. BENSON mayor de edad y domiciliado en EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA suscribó el documento que antecede.-----

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ATTORNEY-IN-FACT de WYETH LLC.----------

3. Que WYETH LLC con sede principal ubicada en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.----------

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que está es legitima.----------

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténticado(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009.- NOTARY PUBLIC (Signature): (Firmado).-

Nancy M. George.- My Commission Expires 30 June 2009.-

(Sellado).----------

TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTA ORIGINALMENTE EN INGLES.- Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mi, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Públic, Distrito de Columbia.- Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011.".- (Hay otra firma ilegible).- Apostilla adjunta: Distrito de Columbia.- APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961).----------

1. País: Estados Unidos de América.- El presente documento público.----------

2. Ha sido firmado por: Lisa Renee Johnson.- Notario Público en y para el Distrito de Columbia.----------

3. Actuando en calidad de: Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia.----------

4. Lleva el sello/estampilla de: Certificado.----------

5. En: Washington D.C.----------

6. El: Día 7 de mayo de 2010.----------

7. Por: El Secretario del Distrito de Columbia.----------

8. Bajo el No.: 229806.----------

9. Sello / estampilla: Distrito de Columbia.- (Firmado).----------

10. Firma: Stephanie D.Scott.- Traductor Oficial.- JORGE E. SIERRA REYES.- Licencia 376-1993 Minjusticia.- MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES 160507 JORGE SIERRA CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS.- NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO 2010 MAY 27 A 10:17 (FIRMADO) JEFE DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.----------

DISTRICT OF COLUMBIA.- APOSTILLE.- (Convention de La Haye du 5 octobre 1961).----------

1. District of Columbia United States of America.----------

2. This public document has been sogned by LISA RENEE JOHNSON.----------

3. acting on the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE.-------

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA.- CERTIFIED.----------

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

5. at Washington, D.C.----------

6. the 7 day of MAY 2010.----------

7. by Secretary of the District of Columbia.----------

8. No. 229806.----------

9. Seal/Stamp.----------

10. Signature.- (Firmado) Stephanie D. Scott.----------

SEGUNDA.-Que de conformidad con lo expuesto y atendiendo a las prescripciones del artículo 47 del Decreto 960 de 1970, el documento mencionado, contenidos en cuatro (4) folios útiles, quedan legalmente protocolizados ante el Notario Treinta y Ocho (38) del Círculo Bogotá, de manera que desde ahora quedan bajo su custodia y guarda para que surtan los efectos legales a que haya lugar y los interesados puedan consultarlos y obtener las copias que de el solicite.-

---------- **HASTA AQUÍ EL CONTENIDO -DE LA MINUTA** ----------

SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta Escritura de la **obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto,** a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto. ----------

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. ----------

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. ----------

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Articulo 35 decreto ley 960 de 1.970).----------

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995,

LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los comparecientes bajo la gravedad del juramento manifiestan clara y expresamente que todos los dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en este instrumento fueron adquiridos por medios y actividades licitas. Así como el dinero con el que se efectúa el pago de los gastos notariales. ----------

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. LEÍDO EL PRESENTE INSTRUMENTO POR EL OTORGANTE Y ADVERTIDO DE SU REGISTRO DENTRO DEL TÉRMINO DE LEY, ESTUVO DE ACUERDO CON ÉL LO ACEPTÓ EN LA FORMA COMO ESTÁ REDACTADO Y EN TESTIMONIO DE QUE LE DA SU ASENTIMIENTO Y APROBACIÓN LO FIRMA POR ANTE MÍ Y CONMIGO EL NOTARIO QUE DE TODO LO EXPUESTO DOY FE Y POR ELLO LO AUTORIZO.----------

CONSTANCIA: EL PRESENTE INSTRUMENTO SE EXTIENDE EN LAS SIGUIENTES HOJAS DE PAPEL NOTARIAL Nos.

/ /00005/ 856805/ 856810/ 856827//

DERECHOS NOTARIALES: RESOLUCIÓN No. 10301 DEL 17 DE DICIEMBRE DE 2.009. $ 42,860

CARLOS REINALDO OLARTE

C. C. No. 79782747 de Bogotá

ESTADO CIVIL: CASADO

DIRECCIÓN RESIDENCIA:

DIRECCIÓN OFICINA: Diagonal 34 No 5-28

TELEFONO RESIDENCIA:

TELEFONO OFICINA: 601 7700

CELULAR: 315 7901625.

EL(LA) NOTARIO (A) TREINTA Y OCHO (38)

DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

EDUARDO DURAN GOMEZ.

S.B.

REPUBLICA DE COLOMBIA
EDUARDO DURAN GOMEZ
NOTARIO
NOTARIA
38
TREINTA Y OCHO DE BOGOTA D.C.

YanethG/201005163

Z. JUAREZ

Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mí, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Públic, Distrito de Columbia. Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011."

(Hay otra firma ilegible).

Apostilla adjunta:

Distrito de Columbia	
APOSTILLA:	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
El presente documento público	
2. Ha sido firmado por:	Lisa Renee Johnson
3. Actuando en calidad de:	Notario Público en y para el Distrito de Columbia
4. Lleva el sello/estampilla de:	Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia
Certificado	
5. En:	Washington D.C.
6. El:	Día 7 de mayo de 2010
7. Por:	El Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el No.:	229806
9. Sello / estampilla:	Distrito de Columbia
10. Firma:	(Firmado) Stephanie D. Scott.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

8

Eduardo Virgen Gomez
Notary Public District of Columbia

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
   United States of America
2. This public document has been signed by LISA RENEE JOHNSON
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 7 day of MAY 2010
7. by *Secretary of the District of Columbia*
8. No. 229806
9. Seal/Stamp

10. Signature

Stephanie D. Scott

86 - PO138

OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guevara
Alvaro Sabbagh

Of C[illegible]
Guillermo C[illegible]
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

The undersigned, **General Power**

El suscrito, **Poder General**

WYETH LLC

domiciled in

domiciliado en

Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** , legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal, y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma: Gregg C. Benson
Attorney-in-Fact

Date/Fecha: 4 MAY 2010

City,Country/Ciudad,País: GROTON, CONNECTICUT USA

5/7 Colombia NC

PFIZER

9

Eduardo Duenas Gomez

The District of Columbia: SS
subscribed and sworn to before me
this 1st day of June 2010

Lisa Renee Johnson
Notary Public, DC
My commission expires 10/14/2011

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification	**Certificación Notarial**
On this date, May 6, 2010	En esta fecha,
The undersigned Notary Public certifies:	el Notario Público suscrito certifica:
1. That	1. Que
GREGG C. BENSON	
of legal age and domiciled in	mayor de edad y domiciliado
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA	
signed the foregoing document.	suscribió el documento que antecede.
2. That the grantor has executed the foregoing document as ATTORNEY-IN-FACT of **WYETH LLC**	2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de
3. That **WYETH LLC** having its principal place of business located in Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.	4. Que con sede principal ubicada en está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.	4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.
5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009	5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature): Nancy M George
Nancy M. George

NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires 30 June 2011

10

PRIMERA (1) COPIA (FOTOCOPIA) DE LA

ESCRITURA No. 5101 DE FECHA CUATRO DEL MES

DE JUNIO DE 2010 TOMADA DE SU ORIGINAL

CONFORME AL ART. 41 DEL DECRETO 2148 DE 1983, QUE SE EXPIDE EN

BOGOTA D.C., A OCHO DEL MES DE JUNIO

DE DOS MIL DIEZ (2010), EN SIETE

(07) FOLIOS UTILES CON DESTINO A: EL INTERESADO

REPUBLICA DE COLOMBIA

EDUARDO DURAN GOMEZ

NOTARIO TREINTA Y OCHO (38)

NOTARIA 38 DE BOGOTA, D.C.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
2 July 2009 (02.07.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/082664 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/005 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/087375

(22) International Filing Date:
18 December 2008 (18.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/015,868 21 December 2007 (21.12.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **WYETH** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **KAYLAN, Narender, Kumar** [US/US]; 232 North Walnut Street, Ridgewood, NJ 07450 (US). **YURGELONIS, Irina** [US/US]; 719 Midwood Road, Ridgewood, NJ 07450 (US). **HENDRY, Roger, Michael** [US/US]; 384 Route 17a, Warwick, NY 10990 (US). **CUTLER, Mark** [US/US]; 104 Natalie Court, Bloomingdale, NJ 07403 (US). **SYVERTSEN, Kristen, Elissa** [US/US]; 12 Tappan Landing Road,, Unit 52b, Tarrytown, NY 10291 (US).

(74) Agent: **MALLON, Veronica**; Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED ATTENUATED VESICULAR STOMATITIS VIRUS, COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEROF

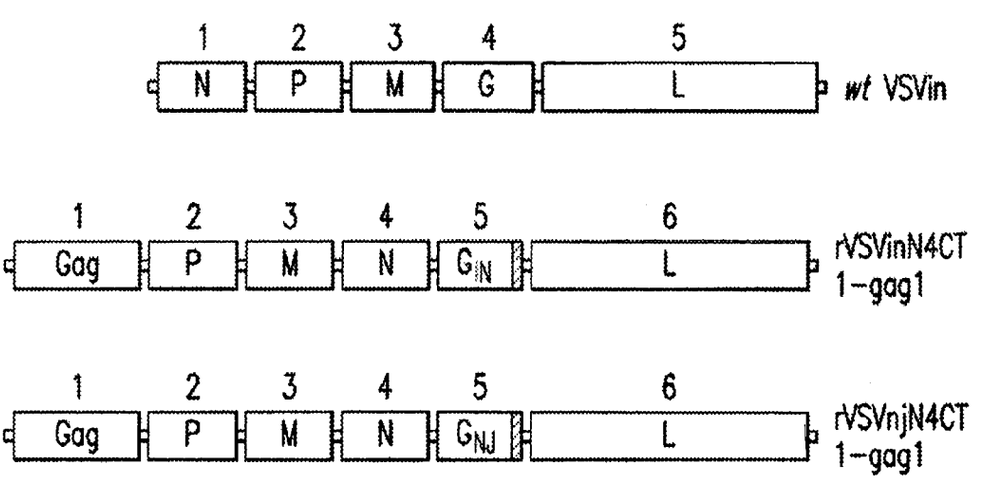


FIG. 1

(57) Abstract: The present invention relates to methods for generating genetically modified and attenuated strains of vesicular stomatitis virus (VSV) for use in the preparation of immunogenic compositions. More particularly, the invention relates to the identification of particular genetic modifications of attenuated VSV that result in an increased yield of virus and an increase in stability of the attenuated strains for preparation of the immunogenic compositions. Methods for cell culture propagation and use in large scale production of VSV is also disclosed.

WO 2009/082664 A2

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

GENETICALLY MODIFIED ATTENUATED VESICULAR STOMATITIS VIRUS, COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

GOVERNMENT SUPPORT CLAUSE

The research leading to the present invention was supported, at least in part, by National Institutes of Health contract number N01-A1-25458. Accordingly, the Government may have certain rights in the invention.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to negative-strand RNA viruses. In particular, the invention relates to methods and compositions for adapting Vesicular Stomatitis Virus (VSV) particles to growth in cell culture for use in production.

BACKGROUND TO THE INVENTION

Vesicular stomatitis virus (VSV) is a prototypic virus of the Rhabdoviridae family, belonging to the order Mononegavirales, which includes single stranded, non-segmented, negative-sense RNA viruses with highly conserved gene order. The 11-kb VSV genome contains five genes encoding five viral proteins: the nucleocapsid protein (N), the phosphoprotein (P), the matrix protein (M), the attachment glycoprotein (G), and the RNA-dependent RNA polymerase (L). The gene order in the genome is 3'-N-P-M-G-L-5' and a number of studies have demonstrated that gene expression is obligatorily sequential from a single 3' promoter (Rose and Whitt, Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication. *In* "Fields Virology", 4th Edition, Vol. 1. Lippincott and Williams and Wilkins, 1221-1244, 2001).

The N gene encodes the nucleocapsid protein responsible for encapsidating the genome while the P (phosphoprotein) and L (large) coding sequences specify subunits of the RNA-dependent RNA polymerase. The matrix protein (M) promotes virion maturation and lines the inner surface of the virus particle. VSV encodes a single envelope glycoprotein (G), which serves as the cell attachment protein, mediates membrane fusion, and is the target of neutralizing antibodies.

The two most common serotypes of VSV in the western hemisphere are designated as Indiana (VSVin) and New Jersey (VSVnj). In nature, VSV infects

livestock causing a self-limiting disease. Although naturally occurring human infections with VSV are infrequent, cases of VSV infections have been reported for individuals directly exposed to infected livestock or within laboratory environments. VSV infection of humans is typically asymptomatic or results in a mild influenza-like illness (Fields, B. N., and K. Hawkins, N. Engl. J. Med. 277:989-94, 1967). Among small mammals, mice can easily be infected experimentally via a variety of inoculation routes and thus serve as an excellent small animal model for immunogenicity, pathogenicity and neurovirulence studies (Bruno-Lobo, et al. An. Microbiol. (Rio J.) 15:53-68,1968; Bruno-Lobo, et al., An. Microbiol. (Rio J.) 15:69-80, 1968; Flanagan, E. B. et al. J. Virol. 77:5740-8, 2003; Wagner, R. R. Infect. Immun. 10:309-315, 1974; Huneycutt, et al. J. Virol. 67:6698-706, 1993).

In the past few years, VSV has demonstrated promise as a vector for immunogenic compositions containing a number of human pathogens including HIV, papilloma virus, RSV, hepatitis C virus and influenza virus. Numerous properties make VSV an attractive candidate vector for human use (Bukreyev, et al. J. Virol. 80:10293-306, 2006; Clarke, et al. Springer Semin Immunopathol. 28: 239-253, 2006). These properties include: 1) VSV is not a human pathogen; 2) there is little pre-existing immunity that might impede its use in humans; 3) VSV readily infects many cell types; 4) it propagates efficiently in cell lines suitable for manufacturing immunogenic compositions; 5) it is genetically stable; 6) methods exist by which recombinant virus can be produced; 7) VSV can accept one or more foreign gene inserts and direct high levels of expression upon infection; and 8) VSV infection is an efficient inducer of both cellular and humoral immunity. Such studies have been greatly facilitated by the advent of a reverse genetics technique that allows for easy recovery of rVSV from genomic cDNA (Lawson, et al. Proc Natl Acad Sci USA 92:4477-81, 1995; Schnell, et al. EMBO J 13:4195-203, 1994). In addition, the relatively small and simple genome organization of VSV has proven amenable to foreign gene insertion, with the resulting viruses producing high levels of foreign protein. The first vectors were designed with foreign coding sequence inserted between the G and L genes along with the requisite intergenic transcriptional control elements. These prototype vectors were found to elicit potent immune responses against the foreign antigen and were well tolerated in the animal models in which they were tested (Grigera, et al. Virus Res 69:3-15, 2000; Kahn et al. J Virol

75:11079-87, 2001; Roberts, et al. J Virol 73:3723-32, 1999; Roberts, et al. J Virol 72:4704-11, 1998, Rose, et al. Cell 106:539-49, 2001; Rose, et al. J Virol 74:10903-10, 2000; Schlereth, et al. J Virol 74:4652-7, 2000). Notably, Rose et al. found that coadministration of two vectors, one encoding HIV-1 env and the other encoding SIV gag, produced immune responses in immunized macaques that protected against challenge with a pathogenic SHIV (Rose, et al. Cell 106:539-49, 2001). Most of these studies were conducted with prototypic VSV vectors that were derived from a wild type (wt) VSV backbone and were shown to be significantly attenuated compared to the wt VSV (Roberts, et al. J. Virol. 72: 4704-11, 1998). More recent studies showed that prototype VSV vectors, when evaluated in a non-human primate model for neurovirulence, caused a significant level of injury to neurological tissues, albeit at reduced levels compared to the wild type virus (Johnson, et al. Virol. 360, 36-49, 2007). These observations led to the conclusion that the prototype rVSV vector might not be adequately attenuated for use in humans.

The development of scaleable propagation methods that are compliant with regulations governing manufacture of immunogenic compositions for administration to humans remains a hurdle that must be addressed before clinical evaluation can be justified. When designing a vector for administration to humans, it is imperative that the mutations that result in virus attenuation are stable and that the yields of virus are sufficient for scaled-up production. A single human dose is expected to be at least $1x10^7$ IUs, thus, manufacturing of a vector will be practical only if greater than 10^7 IUs are produced per ml of culture medium.

There is a need in the art for methods of adapting attenuated VSV particles for increased growth in cell culture, wherein the yields of attenuated VSV particles recovered are sufficient to be of use in large-scale manufacture. Desirably, such methods would employ cells qualified for commercial production. In addition, such methods should retain the original mutations that resulted in virus attenuation, while at the same time improving the yields to sufficient levels for scaled-up production.

The citation of any reference herein should not be deemed as an admission that such reference is available as prior art to the instant invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, there is provided a process or a method for adaptation of a highly attenuated VSV recombinant to tissue culture conditions by continuous passaging at low multiplicity of infection (MOI) in Vero cells or in any susceptible cell substrate. The multiple serial passaging process results in genotypic changes characterized by progressive accrual of a number of nucleotide (NT) substitutions throughout the viral genome. Most of these nucleotide substitutions result in amino acid (AA) substitutions in the VSV proteins. This process resulted in phenotypic adaptation of the virus, accompanied by substantial improvements in virus yield. Passage in Vero cells is continued until genotypic and phenotypic stability is achieved, usually in 10 to 15 serial passages (P10 – P15). Further passaging of the virus beyond P15 showed few or no additional substitutions and did not result in further enhancement of virus yields. This process results in substantial improvement in manufacturing yield as well as enhanced manufacturing consistency. The adaptive mutations did not substantially affect the neurovirulence (NV) of the passaged virus when tested in the highly sensitive mouse intracranial NV animal model

Accordingly, one aspect of the invention provides an isolated, genetically modified vesicular stomatitis virus (VSV) having at least one amino acid mutation in a region corresponding to at least one of the following positions:

the amino acids at positions 119 or 142 of the M protein;

the amino acids at positions 109, 224, 438, 477, or 481 of the G protein; and

the amino acids at positions 205, 220 or 1450 of the L protein.

In one embodiment of the invention, the nucleic acid encoding the genetically modified VSV further comprises a nucleic acid encoding at least one heterologous antigen, or a fragment thereof. It is envisioned that the one heterologous antigen, or a fragment thereof, is from a pathogenic microorganism. The pathogenic microorganism from which the nucleic acid encoding the heterologous antigen is obtained may be selected from the group consisting of a virus, a bacterium, a protozoan and a fungus. In one embodiment, the heterologous antigen may be selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV) antigen, an HTLV antigen, an SIV antigen, an RSV antigen, a PIV antigen, an HSV antigen, a

CMV antigen, an Epstein-Barr virus antigen, a Varicella-Zoster virus antigen, a mumps virus antigen, a measles virus antigen, an influenza virus antigen, a poliovirus antigen, a rhinovirus antigen, a hepatitis A virus antigen, a hepatitis B virus antigen, a hepatitis C virus antigen, a Norwalk virus antigen, a togavirus antigen, an alphavirus antigen, a rubella virus antigen, a rabies virus antigen, a Marburg virus antigen, an Ebola virus antigen, a papilloma virus antigen, a polyoma virus antigen, a metapneumovirus antigen, a coronavirus antigen, a *Vibrio cholerae* antigen, a *Plasmodium falciparum* antigen, a *Plasmodium vivax* antigen, a *Plasmodium ovale* antigen, a *Plasmodium malariae* antigen, a *Plasmodium knowlesi* antigen, a *Streptococcus pneumoniae* antigen, *Streptococcus pyogenes* antigen, a *Helicobacter pylori* antigen, a *Streptococcus agalactiae* antigen, a *Neisseria meningitidis* antigen, a *Neisseria gonorrhoeae* antigen, a *Corynebacterium diphtheriae* antigen, a *Clostridium tetani* antigen, a *Bordetella pertussis* antigen, a *Haemophilus* antigen, a *Chlamydia* antigen and an *Escherichia coli* antigen.

In one embodiment of the invention, the nucleic acid encoding the genetically modified VSV further comprises a nucleic acid encoding a heterologous antigen that is a human immunodeficiency virus (HIV) protein. In one embodiment, the HIV protein is encoded by a gene selected from the group consisting of *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* and *vpu.* In one embodiment, the HIV protein is an HIV gag protein. In one embodiment, the HIV gag protein has at least one mutation at position 165, 270, 329, or 348.

In one embodiment, the genetically modified VSV has a mutation that comprises a conservative or non-conservative amino acid change.

In one embodiment, the genetically modified VSV has a mutation that is at either position 119 or 142 of the M protein or is at both positions 119 and 142 of the M protein. In one embodiment, the mutation of the amino acid at position 119 of the M protein is a T→ N mutation and the mutation of the amino acid at position 142 of the M protein is a P → T mutation or a P → Q mutation.

In one embodiment, the genetically modified VSV has a mutation of the amino acids at position 109, 224, 438, 477 or 481 of the G protein that is a K → N, N → T, S → I, A → V/G → L or V → I mutation, respectively.

In one embodiment, the genetically modified VSV has a mutation of the amino acid at position 205, 220 or 1450 of the L protein that is P → L, K → E, or L → I, respectively.

In one embodiment, the genetically modified VSV further comprises a nucleic acid molecule encoding the HIV gag protein, wherein the HIV gag protein has a mutation in at least one of the amino acids at position 165, 270, 329 or 348, wherein the mutation is S → G, L → S, D → N or T → K, respectively.

In one embodiment, the mutations noted above in the genetically modified VSV result in increased stability of the virus genotype and/or phenotype. In one embodiment, the mutations noted above in the genetically modified VSV further result in increased yield in virus production from a cell infected with the genetically modified VSV.

In one embodiment, the genetically modified VSV further comprises at least two other mutations in its genome. In one embodiment, the mutations may be selected from the group consisting of a temperature-sensitive mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

A second aspect of the invention provides a method for producing the genetically modified VSV as described herein, the method comprising serial passaging of a VSV in a susceptible mammalian cell line at a low multiplicity of infection (MOI) ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU)/ml for at least 5-15 passages, wherein the virus has a titer of at least 1×10^6 PFU/ml and at least one or more of the mutations as described herein.

In one embodiment, the method described above results in a genetically modified and attenuated virus that has a titer of at least 1×10^7 PFU/ml.

In one embodiment, the method described above utilizes a susceptible cell line, that is, any cell line that is capable of being infected with the genetically modified VSV as described herein. For example, a susceptible cell line may include, but is not limited to, a Vero cell line, baby hamster kidney (BHK) cells, or a human embryonic kidney cell line, such as, a 293 cell line.

In one embodiment, the method described above results in a 5 to 100 fold higher yield of virus compared to that obtained with a virus strain that has not been

passaged for about 5 to 15 times at a low MOI ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU)/ml.

In one embodiment, the method described above results in an increase in stability of the virus genotype and/or phenotype.

A third aspect of the invention provides an immunogenic composition comprising any one or more of the genetically modified VSV described above and a pharmaceutically acceptable carrier.

In one embodiment, the immunogenic composition further comprises an adjuvant.

A fourth aspect of the invention provides a method for protecting a mammal against infection with a pathogenic microorganism, the method comprising administering an immunologically effective amount of any one or more of the genetically modified VSV as described herein.

A fifth aspect of the invention provides a method for adapting a virus for growth in cell culture comprising

a. infecting the cell culture with the virus at a low multiplicity-of-infection (MOI) ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU) per cell;

b. harvesting the cell culture medium containing the virus;

c. clarifying the cell culture medium;

d. freezing the cell culture medium; and

e. repeating steps a) through d) for about 5 to about 15 times,

wherein the method results in a 5 to 100 fold increase in virus production/yield and an increase in the stability of the virus genotype and phenotype.

In one embodiment, the method described herein utilizes a virus that is an attenuated virus. In one embodiment, the method is adapted for large scale production of a viral immunogenic composition. In one embodiment, the method results in a 5 to 100 fold higher yield of virus compared to that obtained with a virus strain that has not been passaged for about 5 to 15 times at a low multiplicity of infection ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units per cell. In one embodiment, the method described above allows for maintaining any pre-existing mutation(s) associated with virus attenuation. The pre-existing mutation(s) associated with virus attenuation may be selected from the group consisting of a

temperature-sensitive mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation. In one embodiment, the method allows for maintaining a low neurovirulence profile associated with virus attenuation. In one embodiment, the attenuated virus used in the methods described above is a strain of vesicular stomatitis virus (VSV). In one embodiment, the methods described above utilize a genetically modified VSV that has at least one amino acid mutation in a region corresponding to at least one of the following positions:

the amino acids at positions 119 or 142 of the M protein;

the amino acids at positions 109, 224, 438, 477, or 481 of the G protein; and

the amino acids at positions 205, 220 or 1450 of the L protein.

In one embodiment, the method described herein utilizes a Vesicular Stomatitis Virus that has a mutation that comprises a conservative or non-conservative amino acid change. In one embodiment, the mutation may be at either position 119 or 142 of the VSV M protein or is at both positions 119 and 142 of the M protein. In one embodiment, the mutation of the amino acid at position 119 of the M protein is a T→ N mutation and the mutation of the amino acid at position 142 of the M protein is a P → T or a P → Q mutation.

In one embodiment, the mutation may be at position 109, 224, 438, 477 or 481 of the VSV G protein and may be a K → N, N → T, S → I, A → V / G→L , or V → I mutation, respectively.

In one embodiment, the mutation may be at position 205, 220 or 1450 of the VSV L p

In one embodiment of the invention, the methods described herein utilize a strain of VSV that may be selected from an Indiana serotype (ATCC, VR-1238), a New Jersey serotype (ATCC, VR-1239), an Isfahan serotype (PMID:192094), a Chandipura serotype (ATCC, VR-476) or other vesiculoviruses.

In one embodiment of the invention, the methods described herein utilize a strain of VSV that contains a nucleic acid encoding at least one heterologous antigen. The heterologous antigen is obtained from a pathogenic microorganism selected from the group consisting of a virus, a bacterium, a protozoan and a fungus.

The heterologous antigen may be selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV) antigen, an HTLV antigen, an SIV antigen, an RSV antigen, a PIV antigen, an HSV antigen, a CMV antigen, an Epstein-Barr virus antigen, a Varicella-Zoster virus antigen, a mumps virus antigen, a measles virus antigen, an influenza virus antigen, a poliovirus antigen, a rhinovirus antigen, a hepatitis A virus antigen, a hepatitis B virus antigen, a hepatitis C virus antigen, a Norwalk virus antigen, a togavirus antigen, an alphavirus antigen, a rubella virus antigen, a rabies virus antigen, a Marburg virus antigen, an Ebola virus antigen, a papilloma virus antigen, a polyoma virus antigen, a metapneumovirus antigen, a coronavirus antigen, a *Vibrio cholerae* antigen, a *Plasmodium falciparum* antigen, a *Plasmodium vivax* antigen, a *Plasmodium ovale* antigen, a *Plasmodium malariae* antigen, a *Plasmodium knowlesi* antigen, a *Streptococcus pneumoniae* antigen, *Streptococcus pyogenes* antigen, a *Helicobacter pylori* antigen, a *Streptococcus agalactiae* antigen, a *Neisseria meningitidis* antigen, a *Neisseria gonorrhoeae* antigen, a *Corynebacterium diphtheriae* antigen, a *Clostridium tetani* antigen, a *Bordetella pertussis* antigen, a *Haemophilus* antigen, a *Chlamydia* antigen, and an *Escherichia coli* antigen.

In one embodiment, the heterologous antigen comprises an HIV protein. In one embodiment, the HIV protein is encoded by a gene selected from the group consisting of *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* and *vpu.* In one embodiment, the HIV protein is an HIV gag protein. In one embodiment, the HIV gag protein has at least one mutation at position 165, 270, 329 or 348.

In one embodiment, the mutation of the amino acid at position 165, 270, 329 or 348 of the HIV gag protein is S → G, L → S, D → N, or T → K, respectively.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGURE 1: Schematic genomic organization of *wt* VSV and *attn* VSVN4CT1-gag1 (IN and NJ serotypes).

FIGURE 2: Outline of the experimental protocol used to serially passage virus in Vero cells. The viruses at every 5th passage were analyzed by indicated assays.

FIGURE 3: Adaptive amino acid substitutions accrued in IN serotype of attenuated VSV (rVSVinN4CT1-gag1) virus following serial passage in Vero cells.

FIGURE 4: Adaptive amino acid substitutions accrued in NJ serotype of attenuated VSV (rVSVnjN4CT1-gag1) virus following serial passage in Vero cells.

FIGURE 5: Effect of passage levels on growth kinetics of IN serotype of attenuated rVSVinN4CT1-gag1 virus. Serial passage resulted in a significant increase in yields that exceeded the manufacturing target of ≥ 10^7 PFU/ml. There was no significant change in growth after passage 15.

FIGURE 6: Effect of passage levels on growth kinetics of NJ serotype of attenuated rVSVnjN4CT1-gag1 virus.

FIGURE 7: Results of neurovirulence (NV) testing of rVSVinN4CT1-gag1 passaged viruses P0 to P25 in the mouse intracranial (IC) LD_{50} animal model as described in Cooper et al., J Virology, 82, 207-29, 2008.

FIGURE 8A-8L: Comparison of the nucleotide (NT) and amino acid (AA) sequences of original (passage 0 or P0) viruses and passage 25 of VSV Indiana serotype. The NT and AA substitutions in the passaged virus are shown in bold.

FIGURE 9A-9M: Comparison of the nucleotide (NT) and amino acid (AA) sequences of original (passage 0 or P0) viruses and passage 25 of VSV New Jersey serotype. The NT and AA substitutions in the passaged virus are shown in bold.

FIGURE 10: Growth Kinetics of VSVinN4CT1-gag1 Bioreactor Runs, Using Low and High Passage Virus

FIGURE 11: Growth Kinetics of VSVnjN4CT1-gag1 Bioreactor Runs, Using Low and High Passage Virus

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the present methods and treatment methodology are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for purposes of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, references to "the method" includes one or more methods, and/or steps of the type described herein and/or which will become apparent to those persons skilled in the art upon reading this disclosure and so forth.

Accordingly, in the present application, there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, *e.g.*, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach,* Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

Definition

The terms used herein have the meanings recognized and known to those of skill in the art, however, for convenience and completeness, particular terms and their meanings are set forth below.

The term "about" means within 20%, preferably within 10%, and more preferably within 5%.

The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). Depending on the circumstances, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, may fail to elicit a sufficient humoral or cellular immune response. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus are useful as adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms); the interferons-α, β and γ; granulocyte-

macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (see, *e.g.,* U.S. Patent No. 5,078,996 and ATCC Accession Number 39900); macrophage colony stimulating factor (M-CSF); granulocyte colony stimulating factor (G-CSF); and the tumor necrosis factors α and β. Still other adjuvants that are useful with the immunogenic compositions described herein include chemokines, including without limitation, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES; adhesion molecules, such as a selectin, *e.g.*, L-selectin, P-selectin and E-selectin; mucin-like molecules, *e.g.*, CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1; a member of the integrin family such as LFA-1, VLA-1, Mac-1 and p150.95; a member of the immunoglobulin superfamily such as PECAM, ICAMs, e.g., ICAM-1, ICAM-2 and ICAM-3, CD2 and LFA-3; co-stimulatory molecules such as CD40 and CD40L; growth factors including vascular growth factor, nerve growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, B7.2, PDGF, BL-1, and vascular endothelial growth factor; receptor molecules including Fas, TNF receptor, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, and DR6; and Caspase (ICE).

Suitable adjuvants used to enhance an immune response further include, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A, Corixa, Hamilton, MT), which is described in U.S. Patent No. 4,912,094. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa (Hamilton, MT), and which are described in United States Patent No. 6,113,918. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyoxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl-amino]-b-D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form (AF) or as a stable emulsion (SE).

Still other adjuvants include muramyl peptides, such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanine-2-(1'-2' dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (MTP-PE); oil-in-water emulsions, such as MF59 (International PCT Publication No. WO 90/14837) (containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA)), and

SAF (containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP, either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion); incomplete Freund's adjuvant (IFA); aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate; Amphigen; Avridine; L121/squalene; D-lactide-polylactide/glycoside; pluronic polyols; killed *Bordetella*; saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), described in U.S. Patent No. 5,057,540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), described in U.S. Patent No. 5,254,339, and immunostimulating complexes (ISCOMS); *Mycobacterium tuberculosis*; bacterial lipopolysaccharides; synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (*e.g.*, U.S. Patent No. 6,207,646); IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), described in European Patent Nos. 1,296,713 and 1,326,634; a pertussis toxin (PT) or mutant thereof, a cholera toxin or mutant thereof (, *e.g.*, International PCT Publication Nos. WO00/18434, WO02/098368 and WO02/098369); or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; see, *e.g.*, International PCT Publication Nos. WO 93/13302 and WO 92/19265.

The term "antigen" refers to a compound, composition, or immunogenic substance that can stimulate the production of antibodies or a T-cell response, or both, in an animal, including compositions that are injected or absorbed into an animal. The immune response may be generated to the whole molecule, or to a portion of the molecule (*e.g.,* an epitope or hapten). The term may be used to refer to an individual macromolecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic macromolecules. An antigen reacts with the products of specific humoral and/or cellular immunity. The term "antigen" broadly encompasses moieties including proteins, polypeptides, antigenic protein fragments, nucleic acids, oligosaccharides, polysaccharides, organic or inorganic chemicals or compositions, and the like. The term "antigen" includes all related antigenic epitopes. Epitopes of a given antigen can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, e.g., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. For example, linear epitopes may be determined by e.g., concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still

attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, e.g., U.S. Pat. No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715, all incorporated herein by reference in their entireties. Similarly, conformational epitopes are readily identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, e.g., x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Furthermore, for purposes of the present invention, an "antigen" can also be used to refer to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but they may be non-conservative), to the native sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or through particular synthetic procedures, or through a genetic engineering approach, or may be accidental, such as through mutations of hosts, which produce the antigens. Furthermore, the antigen can be derived or obtained from any virus, bacterium, parasite, protozoan, or fungus, and can be a whole organism. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide, which expresses an antigen, such as in nucleic acid immunization applications, is also included in the definition. Synthetic antigens are also included, for example, polyepitopes, flanking epitopes, and other recombinant or synthetically derived antigens (Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75:402 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 Jul. 3, 1998).

The term "attenuated" refers to a strain of pathogen whose pathogenicity has been reduced so that it will initiate an immune response without producing the specific disease. An attenuated strain of a virus is less virulent than the parental strain from which it is derived. Conventional means are used to introduce attenuating mutations to generate a modified virus, such as chemical mutagenesis during virus growth in cell cultures to which a chemical mutagen has been added. An alternative means of introducing attenuating mutations comprises making pre-determined mutations using site-directed mutagenesis. One or more mutations may be introduced. These viruses are then screened for attenuation of their biological activity in cell culture and/or in an animal model. If the attenuated phenotype of the

rescued virus is present, challenge experiments can be conducted with an appropriate animal model. Non-human primates can serve as an appropriate animal model for the pathogenesis of human disease. These primates are first immunized with the attenuated, recombinantly-produced virus, then challenged with the wild-type form of the virus.

The terms "cell", "host cell", "cell culture" and the like as used herein are intended to include any individual cell or cell culture which can be or have been recipients for viruses, vectors or the incorporation of exogenous nucleic acid molecules, polynucleotides and/or proteins. It is also intended to include progeny of a single cell. However, the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic or total DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. The cells are preferably eukaryotic, but may be prokaryotic and include, but are not limited to, bacterial cells, yeast cells, animal cells, and mammalian cells (e.g., murine, rat, simian or human).

The term "clarifying", as used herein, refers to an early step in virus purification, whereby the cells and cellular debris is removed after infection of cells or a cell culture with the virus of the present invention. For example, an early step in virus purification involves "clarifying" the cell culture medium to remove cell debris using a method such as low speed centrifugation (≤ 10,000 RPM) or filtration. The virus present in the supernatant is then isolated and purified using methods known to those skilled in the art, such as high speed centrifugation (eg. 100,000 x g) through a sucrose cushion or isolation through an ion exchange column, such as that described in U.S. Patent Publication 20070249019.

It is noted that in this disclosure, terms such as "comprises", "comprised", "comprising", "contains", "containing" and the like can have the meaning attributed to them in U.S. patent law; *eg.,* they can mean "includes", "included", "including" and the like. Terms such as "consisting essentially of" and "consists essentially of" have the meaning attributed to them in U.S. patent law, *eg.,* they allow for the inclusion of additional ingredients or steps that do not detract from the novel or basic characteristics of the invention, *ie.*, they exclude additional unrecited ingredients or steps that detract from novel or basic characteristics of the invention, and they exclude ingredients or steps of the prior art, such as documents in the art that are cited herein or a re incorporated by reference herein, especially as it is a goal of this

document to define embodiments that are patentable, *eg.,* novel, nonobvious, inventive, over the prior art, *eg.,* over documents cited herein or incorporated by reference herein. And, the terms "consists of" and "consisting of" have the meaning ascribed to them in U.S. patent law; namely, that these terms are closed ended.

A "conservative amino acid substitution" refers to the substitution of one or more of the amino acid residues of a protein with other amino acid residues having similar physical and/or chemical properties. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. Amino acids containing aromatic ring structures are phenylalanine, tryptophan, and tyrosine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such alterations will not be expected to affect apparent molecular weight as determined by polyacrylamide gel electrophoresis, or isoelectric point. Particularly preferred substitutions are: Lys for Arg and vice versa such that a positive charge may be maintained; Glu for Asp and vice versa such that a negative charge may be maintained; Ser for Thr such that a free --OH can be maintained; and Gln for Asn such that a free NH_2 can be maintained.

The terms "culture fluid", "cell culture fluid", "cell culture media", "media" and/or "bioreactor fluid" are used interchangeably, and refer to the media or solution in which the cell culture is grown.

"Encoded by" or "encoding" refers to a nucleic acid sequence which codes for a polypeptide sequence, wherein the polypeptide sequence contains an amino acid sequence of at least 3 to 5 amino acids, more preferably at least 8 to 10 amino acids, and even more preferably at least 15 to 20 amino acids, a polypeptide encoded by the nucleic acid sequences. Also encompassed are polypeptide sequences, which are immunologically identifiable with a polypeptide encoded by the sequence. Thus, an antigen "polypeptide," "protein," or "amino acid" sequence may have at least 70% similarity, preferably at least about 80% similarity, more preferably about 90-95% similarity, and most preferably about 99% similarity, to a polypeptide or amino acid sequence of an antigen.

"Fragment" refers to either a protein or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 4 amino acid residues (preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues, or at least 150 amino acid residues) of the amino acid sequence of a parent protein or polypeptide, or a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of at least 10 base pairs (preferably at least 20 base pairs, at least 30 base pairs, at least 40 base pairs, at least 50 base pairs, at least 50 base pairs, at least 100 base pairs, at least 200 base pairs) of the nucleotide sequence of the parent nucleic acid. Any given fragment may or may not possess a functional activity of the parent nucleic acid or protein or polypeptide.

A "gene" as used in the context of the present invention is a sequence of nucleotides in a nucleic acid molecule (chromosome, plasmid, etc.) with which a genetic function is associated. A gene is a hereditary unit, for example of an organism, comprising a polynucleotide sequence (e.g., a DNA sequence for mammals) that occupies a specific physical location (a "gene locus" or "genetic locus") within the genome of an organism. A gene can encode an expressed product, such as a polypeptide or a polynucleotide (e.g., tRNA). Alternatively, a gene may define a genomic location for a particular event/function, such as the binding of proteins and/or nucleic acids (e.g., phage attachment sites), wherein the gene does not encode an expressed product. Typically, a gene includes coding sequences, such as polypeptide encoding sequences, and non-coding sequences, such as promoter sequences, poly-adenlyation sequences, transcriptional regulatory sequences (e.g., enhancer sequences). Many eucaryotic genes have "exons" (coding sequences) interrupted by "introns" (non-coding sequences). In certain cases, a gene may share sequences with another gene(s) (e.g., overlapping genes). The term "gene" may or may not include regulatory DNA sequences, such as promoter sequences, which determine for example the conditions under which the gene is expressed. Some genes, which are not structural genes, may be transcribed from DNA to RNA, but are not translated into an amino acid sequence. Other genes may function as regulators of structural genes or as regulators of DNA transcription.

As defined herein, the terms "gene shuffling", "shuffled gene", "shuffled", "shuffling", "gene rearrangement" and "gene translocation" are used interchangeably, and refer to a change (mutation) in the order of the wild-type VSV genome. As defined herein, a wild-type VSV genome has the following gene order: 3'-NPMGL-5'.

The term "genetically modified" generally refers to the introduction of one or more mutations into the virus genome by any means known to those skilled in the art. However, while certain "genetic modifications" may be made by specific deletions, insertions, or substitutions, or by transfer of genetic material into the viral genome using standard genetic engineering techniques, certain genetic modifications of the VSV genome in the present invention occurred by continuous passage of an attenuated VSV at a low multiplicity of infection. This serial passage at low MOI resulted in the progressive accrual of a number of nucleotide substitutions throughout the viral genome and also resulted in amino acid substitutions in the VSV proteins. These "genetically modified" VSV particles were shown to be adapted for increased growth in cells, but without increased neuropathology in small animal models for neurovirulence. In the present invention, "low passage virus", "passage 0" or "P0", and "original virus" are used interchangeably and represent the rVSVN4CT1gag1 virus that served as the starting material for the genetically modified virus of the current invention. In some cases, particularly in the bioreactor runs, these also include viruses passaged 1 to 3 times to indicate low passage viruses. "High passage virus", "passaged virus", "genetically modified virus", "tissue culture-adapted" or "cell-adapted virus" are used interchangeably and represent virus that has been passaged more than 5 times, generally 5 to 25 times, preferably 15 times.

The term "growing" or "growth" as used herein refers to the *in vitro* propagation of virus in cells of various kinds. The growing/growth of virus in cells in the laboratory involves inoculating the cells with the virus, followed by incubating to allow virus production and then harvesting the cell culture medium containing the virus. Virus-infected cells are normally grown in a growth medium within culture vessels (such as flasks or dishes for adherent cells or constantly moving bottles or flasks for cells in suspension) and the cultures are maintained in cell incubators with constant temperature, humidity and gas composition. However, culture conditions can vary depending on the cell type and can be altered to induce changes in the cells or to support or enhance virus production by the cells.

The term "harvesting", as used herein, refers to the collection of cells or cell culture medium in preparation for isolation and purification of virus following the infection of a cell or cell line with any of the virus strains or serotypes described herein.

The term "heterologous" refers to a combination of elements not naturally occurring in a virus or cell. For example, heterologous DNA refers to the DNA not naturally located in the cell, or in a chromosomal site of the cell. The heterologous DNA may include a gene foreign to the cell. The term "heterologous antigen" as used herein is an antigen encoded in a nucleic acid sequence, wherein the antigen is either not from the organism, or is not encoded in its normal position or its native form. A heterologous expression regulatory element is an element operatively associated with a different gene than the one it is operatively associated within nature.

The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, *eg.* a microorganism, which composition can be used to elicit an immune response in a mammal. The immune response can include a T cell response, a B cell response, or both a T cell and B cell response. The composition may serve to sensitize the mammal by the presentation of antigen in association with MHC molecules at the cell surface. In addition, antigen-specific T-lymphocytes or antibodies can be generated to allow for the future protection of an immunized host. An "immunogenic composition" may contain a live, attenuated, or killed/inactivated formulation comprising a whole microorganism or an immunogenic portion derived therefrom that induces either a cell-mediated (T cell) immune response or an antibody-mediated (B cell) immune response, or both, and may protect the animal from one or more symptoms associated with infection by the microorganism, or may protect the animal from death due to the infection with the microorganism.

An "immunologically effective amount" or an "immunogenically effective amount" as used herein refers to the amount of antigen or formulation sufficient to elicit an immune response, either a cellular (T cell) or humoral (B cell or antibody) response, as measured by standard assays known to one skilled in the art. For example, with respect to the present invention, an "immunologically effective amount" is a minimal protection dose (titer) of $\geq$ 5.0 to 7.0 Log_{10}pfu/mL. The effectiveness of

an antigen as an immunogen, can be measured either by proliferation assays, by cytolytic assays, such as chromium release assays to measure the ability of a T cell to lyse its specific target cell, or by measuring the levels of B cell activity by measuring the levels of circulating antibodies specific for the antigen in serum. Furthermore, the level of protection of the immune response may be measured by challenging the immunized host with the antigen that has been injected. For example, if the antigen to which an immune response is desired is a virus or a tumor cell, the level of protection induced by the "immunologically effective amount" of the antigen is measured by detecting the percent survival or the percent mortality after viral, bacterial, protozoal, or fungal challenge of the animals.

The term "isolated" or "purified" means that the material is removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring). For example, an "isolated" or "purified" peptide or protein is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. In the present invention, the virus is isolated or purified from the infected cell or from cellular debris, so that it is provided in a form useful in the manufacture of an immunogenic composition. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of a virus, or a polypeptide/protein in which the virus, or the polypeptide/protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, a virus, or a polypeptide/protein that is substantially free of cellular material includes preparations of the virus or polypeptide/protein having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, or 1%, (by dry weight) of contaminating protein. When the virus or polypeptide/protein is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, or 0.2% of the volume of the protein preparation. When polypeptide/protein is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, i.e., it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. Accordingly, such preparations of the polypeptide/protein have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than polypeptide/protein fragment of interest. An "isolated" or "purified" nucleic acid

molecule is one which is separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid molecule. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule or an RNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

The term "multiplicity of infection" or "MOI" refers to the average number of viral particles that infects a single cell. The "MOI" is calculated by dividing the total number of viral plaque forming units (PFU) with the total number of cells being infected.

As defined hereinafter, the terms "mutation class", "mutation classes" or "classes of mutation" are used interchangeably, and refer to mutations known in the art, when used singly, to attenuate VSV. For example, a "mutation class" of the invention includes, but is not limited to, a VSV temperature-sensitive N gene mutation (hereinafter, "$N_{(ts)}$"), a temperature-sensitive L gene mutation (hereinafter, "$L_{(ts)}$"), a point mutation, a G-stem mutation (hereinafter, "$G_{(stem)}$"), a non-cytopathic M gene mutation (hereinafter, "$M_{(ncp)}$"), a gene shuffling or rearrangement mutation, a truncated G gene mutation (hereinafter, "$G_{(ct)}$"), an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation, a gene deletion mutation and the like. As defined hereinafter, a "mutation" includes mutations known in the art as insertions, deletions, substitutions, gene rearrangement or shuffling modifications.

A "non-conservative amino acid substitution" refers to the substitution of one or more of the amino acid residues of a protein with other amino acid residues having dissimilar physical and/or chemical properties, using the characteristics defined above.

As used herein, the phrase "nucleic acid" or "nucleic acid molecule" refers to DNA, RNA, as well as any of the known base analogs of DNA and RNA or chimeras formed therefrom. Thus, a "nucleic acid" or a "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules") in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in

particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, inter alia, in linear or circular DNA molecules (e.g., restriction fragments), plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5N to 3N direction along the nontranscribed strand of DNA (i.e., the strand having a sequence homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

The term “pathogenic” refers to the ability of any agent of infection, such as a bacterium or a virus, to cause disease. A “non-pathogenic” microorganism refers to a microorganism that lacks the disease causing characteristics for the “pathogenic” strains of a microorganism.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" means a carrier approved by a regulatory agency of a Federal, a state government, or other regulatory agency, or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans as well as non-human mammals. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the pharmaceutical composition is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium

saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. The formulation should suit the mode of administration.

The term "plaque" or "viral plaque" refers to a clear, often round patch of lysed cells in an otherwise opaque layer of a cell culture. A "plaque-forming unit" or "PFU" refers to the average number of infectious viral particles per unit volume. For example, if a virus solution has 100 PFU/ml, this means that every one milliliter of this virus solution has 100 virus particles that can each form a plaque. PFU/ml is the conventional means to refer to a concentration of a plaque forming virus preparation. However, PFU is generally used interchangeably with "infectious unit" or "IU" and represents units of infectious virus in a virus preparation.

The term "protecting" refers to shielding *eg.* a mammal, from infection or a disease, by inducing an immune response to a particular pathogen. Such protection is generally achieved following treating a mammal with an immunogenic composition. The protection provided need not be absolute, i.e., the infection need not be totally prevented or eradicated, if there is a statistically significant improvement compared with a control population of mammals, e.g. infected animals not administered the immunogenic compositions. Protection may be achieved by mitigating the severity or rapidity of onset of symptoms of the infection.

The terms "protein", "polypeptide" and "peptide" refer to a polymer of amino acid residues and are not limited to a minimum length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included within the definition. Both full-length proteins and fragments thereof are encompassed by the definition. The terms also include modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but which may be non-conservative), to a native sequence, preferably such that the protein maintains the ability to elicit an immunological response within an animal to which the protein is administered. Also included are post-expression modifications, eg. glycosylation, acetylation, phosphorylation and the like. The term "amino acid" refers to either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including both the D or L optical isomers, and amino acid analogs. The one letter and three letter codes for each of the natural amino acids are known to those skilled in the art.

Methods of producing recombinant RNA virus are referred to in the art as "rescue" or "reverse genetics" methods. Exemplary rescue methods for VSV are described in U.S. Patent 6,033,886, U.S. Patent 6,596,529 and WO 2004/113517, each incorporated herein by reference. The transcription and replication of negative-sense, single stranded, non-segmented, RNA viral genomes are achieved through the enzymatic activity of a multimeric protein complex acting on the ribonucleoprotein core (nucleocapsid). Naked genomic RNA cannot serve as a template. Instead, these genomic sequences are recognized only when they are entirely encapsidated by the N protein into the nucleocapsid structure. It is only in that context that the genomic and antigenomic terminal promoter sequences are recognized to initiate the transcriptional or replication pathways.

As defined hereinafter, the term "synergistic" attenuation refers to a level of VSV attenuation which is greater than additive. For example, a synergistic attenuation of VSV according to the present invention comprises combining at least two classes of mutation in the same VSV genome, thereby resulting in a reduction of VSV pathogenicity much greater than an additive attenuation level observed for each VSV mutation class alone. Thus, in certain embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} at least greater than the additive attenuation level observed for each mutation class alone (*i.e.*, the sum of the two mutation classes), wherein attenuation levels (*i.e.*, the LD_{50}) are determined in a small animal neurovirulence model. Examples of synergistic attenuation of VSV are described in WO 2005/098009, incorporated herein by reference.

A VSV "temperature-sensitive" ("ts") mutation, as defined hereinafter, is a mutation in the VSV genome, which restricts VSV growth at a non-permissive temperature. For example, a VSV ts mutant of the invention grows normally and to high titer at the permissive temperature (*e.g.*, 31°C), but their growth or reproduction is restricted at non-permissive temperatures (*e.g.*, 37°C or 39°C).

The term "immunogenic composition" refers to pharmaceutical compositions that induce an immune response in an animal. An immunogenic composition may protect the animal from disease or possible death due to an infection, and may or may not include one or more additional components that enhance the immunological activity of the active component. An immunogenic composition may additionally comprise further components typical to immunogenic compositions, including, for

example, an adjuvant or an immunomodulator. The immunogenically active component of an immunogenic composition may comprise complete live organisms in either their original form, or as attenuated organisms, or organisms inactivated by appropriate methods in a killed or inactivated immunogenic compositions, or subunit immunogenic compositions comprising one or more immunogenic components of the virus, or genetically engineered, mutated or cloned immunogenic compositions prepared by methods known to those skilled in the art. An immunogenic composition may comprise one or simultaneously more than one of the elements described above.

General Description

In accordance with the present invention, there is provided a process or a method for adaptation of a highly attenuated recombinant VSV to tissue culture conditions by continuous passaging at low multiplicity of infection (MOI) in Vero cells or in any susceptible cell substrate. The multiple serial passaging process results in genotypic changes characterized by progressive accrual of a number of nucleotide substitutions throughout the viral genome. Most of these nucleotide substitutions result in amino acid (AA) substitutions in the VSV proteins. This process resulted in phenotypic adaptation of the virus, accompanied by substantial improvements in virus yield. Passage in Vero cells is continued until genotypic and phenotypic stability is achieved, usually in 10 to 15 serial passages (P10 – P15). Further passaging of the virus beyond P15 showed few or no additional substitutions and did not result in further enhancement of virus yields. This process results in substantial improvement in manufacturing yield as well as enhanced manufacturing consistency. The adaptive mutations did not substantially affect the neurovirulence (NV) of the passaged virus when tested in the highly sensitive mouse intracranial NV animal model.

In accordance with U.S. Patent Publication No. 2007/0218078A1, a highly attenuated VSV vector expressing the HIV-1 gag gene was generated, rVSVN4CT1-gag1, which was made by combining three virus attenuating approaches: insertion of HIV-1 gag gene in the first position of the genome (gag1), thereby shifting all VSV genes from the 3'-promoter by one position, translocation of VSV N gene to the 4th position (N4) and use of a VSV G with its cytoplasmic tail truncated to 1 amino acid (CT1) (Schnell, et al. The EMBO Journal 17:1289-1296, 1998). Compared to the

prototypic rVSV, this vector displayed a marked increase in attenuation *in vitro* as characterized by smaller plaque phenotype, delayed growth kinetics and greatly reduced peak titers in cell culture. A similar pattern of attenuation was displayed when tested in a highly sensitive murine intracranial (IC) animal model, which showed differences in LD_{50} of many orders of magnitude between the prototypic and attenuated VSV (Cooper et al, J. Virology, 82:207-229, 2008). In addition, compared to prototypic VSV, the attenuated virus displayed minimal to undetectable neuropathology in non-human primates. Although this vector induces potent immune responses in mice and macaques that were comparable to those obtained with the prototype vector, it replicates poorly in cell culture making it suboptimal for scale up and manufacturing.

Based on the encouraging preclinical safety and immunogenicity profile, this vector would make a promising vector candidate for testing in humans. Two factors that are critical for testing of this vector in humans are the stability of the three attenuating mutations noted above and the increased manufacturing yields. In the present study, genetic stability studies were conducted, which consisted of serial passages of rVSV vectors in Vero cells. Viruses were passaged in Vero cells at low multiplicity of infection (MOI, 0.01). The data obtained from the viruses passaged 25 times revealed that while all three vector-attenuating mutations were retained, additional amino acids (AA) substitutions appeared as early as passage 5 (P5). As viruses were passaged further, mutations were fixed by passage 15 (P15). In addition, growth kinetics of the passaged viruses in Vero cells showed progressive improvement in virus yields up to P15, suggesting that accrual of AA substitutions represented continuing adaptation of virus to Vero cells. No further enhancement in virus yields was seen after P15. Results from the growth kinetics with passaged viruses indicated that the virus yield with P15 virus was 5- to 100-fold higher than that obtained with P0 (See Figures 3-6).

Accordingly, this invention demonstrates that P15 viruses exhibit genotypic and phenotypic stability and grow to levels suitable for large-scale manufacturing of clinical trial material suitable for toxicological and clinical evaluation.

Suitable Cells for Growth/Propagation of VSV

Suitable host cells for use within the invention are capable of supporting a productive infection of the genetically modified attenuated VSV, and will permit expression of the requisite vectors and their encoded products necessary to support viral production. Examples of host cells for use in the methods of the present invention include, but are not limited to, Vero cells, baby hamster kidney cells (BHK), and human embryonic kidney (HEK) cells, such as 293 cells. Any other cell that is susceptible to infection with the genetically modified attenuated VSV strains or serotypes described herein, may be used in the methods of the invention.

Production of VSV in a Mammalian Cell Culture

The production of VSV in mammalian cell culture is well known to one of skill in the art, and generally includes infecting the cell culture (host cell) with VSV, growing the VSV in cell culture and harvesting the cell culture at the appropriate time. Because VSV is secreted from the host cell into the media, the VSV product is collected from the cell culture fluid.

The production of VSV from mammalian cell culture employs suitable mammalian cell cultures used to propagate (or grow) VSV, which are known in the art. Such cell cultures include, but are not limited to, human embryonic kidney (HEK) cells such as HEK 293 cells, African green monkey kidney (AGMK) cells such as Vero cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells and baby hamster kidney (BHK) cells.

Additionally, cell culture materials, methods and techniques are well known to one of skill in the art. For example, a recombinant VSV seed stock is used to infect a confluent host cell population or a host cell population at a certain density (e.g., a Vero cell culture) in a bioreactor at a given multiplicity of infection; the VSV is grown in cell culture for a given time and temperature; and the nascent VSV progeny harvested in the cell culture fluid. As defined hereinafter, the terms "culture fluid", "cell culture fluid", "cell culture media", "media" and/or "bioreactor fluid" are used interchangeably, and refer to the media or solution in which the cell culture is grown.

Purification of VSV from a Mammalian Cell Culture

The processes for purifying VSV from cell culture fluid of a mammalian cell culture infected with VSV are generally known to one skilled in the art. For example,

as described in Miller et al. (Protein Expression and Purification, Vol. 33, Issue 1, January 2004, pp. 92-103), culture supernatant containing the virus may be collected and subjected to low-speed centrifugation (eg. 1000 x *g*) to remove cells and debris, followed by high speed centrifugation (eg. 100,000 x g) over a 20% sucrose cushion to remove the virus.

Another method for purification of VSV from cell culture is described in U.S. Patent Publication 2007/0249019. Briefly, this procedure includes the steps of (a) primary clarification, (b) secondary clarification, (c) anion exchange membrane adsorption, (d) tangential flow filtration and (e) filtration. More particularly, such steps comprise (a) clarifying the cell culture fluid by low-speed centrifugation, (b) further clarifying the supernatant by filtration through a 0.2 to 0.45 micron filter, (c) purifying the VSV filtered solution on an anion exchange membrane adsorber, (d) buffer exchanging and concentrating the VSV by tangential flow filtration (TFF) and (e) a final filtration of the VSV retentate through a 0.2 to 0.22 micron filter. The purification process steps (a) through (e) above are performed at room temperature.

Clarification Procedures

Primary Clarification

Also described in U.S. Patent Publication 2007/0249019 is a method for primary clarification of the cell culture fluid to isolate and purify the virus. For example, the cell culture fluid of a mammalian cell culture infected with VSV may be clarified by low-speed centrifugation (or alternatively, by depth filtration) and the VSV recovered in the supernatant, also referred to herein as "primary clarification" of the cell culture fluid. In certain embodiments, primary clarification of the cell culture fluid is conducted at room temperature.

The centrifugation methods and equipment used in the primary clarification of the cell culture fluid are well known to one of skill in the art. As defined hereinafter, "low-speed" centrifugation is a centrifugation speed at or below 10,000 rpm.

As stated above, the cell culture fluid of a mammalian cell culture infected with VSV may be alternatively clarified by depth filtration (i.e., instead of low-speed centrifugation). Depth filtration can be used when low-speed centrifugation is omitted from primary clarification of step (a). Depth filtration (in contrast to surface filtration) generally refers to a "thick" filter that captures contaminants within its structure.

Depth filtration materials and methods are well known to one of skill in the art. For example, the filter material is typically composed of a thick and fibrous cellulosic structure with inorganic filter aids such as diatomaceous earth particles embedded in the openings of the fibers. This filter material has a large internal surface area, which is key to particle capture and filter capacity. Such depth filtration modules contains pores of from 1.0 .micron to 4.5 micron. Exemplary depth filtration modules include, but are not limited to, Whatman® Polycap™. HD modules (Whatman Inc.; Florham Park, N.J.), Sartorius Sartoclear™ P modules (Sartorius Corp.; Edgewood, N.Y.) and Millipore® Millistak+.® HC modules (Millipore; Billerica, Mass.). The cell culture fluid may be clarified via depth filtration (performed at room temperature) and the VSV is recovered in the filtrate.

Secondary Clarification

Also described in U.S. Patent Publication 2007/0249019 is a method for secondary clarification of the cell culture fluid to isolate and purify the virus. After primary clarification via centrifugation (or depth filtration), the VSV supernatant (or filtrate) is further clarified by filtration, or microfiltration, through a 0.2 to 0.25 micron filter and recovery of the VSV in the filtered solution. The microfiltration may be performed at room temperature, as defined above. Filtration/Microfiltration media are available in a wide variety of materials and methods of manufacture, which are known to one of skill in the art. Exemplary microfiltration filter units include, but are not limited to, Millipore Millex.®.-GV filter units (Millipore; Billerica, Mass.), Millipore Millex.®-GP filter units, Pall Supor® filter units (Pall Corp.; East Hills, N.Y.), Sartorius Sartobran™ filter units (Sartorius Corp.; Edgewood, N.Y.) and Sartorius Sartopore™ 2 filter units. In certain embodiments, these filtration units posses filters of a size between 0.2 to 0.45 microns. The filtered VSV is recovered in the filtered solution.

Anion Exchange Membrane Adsorption

Once the VSV has been recovered after clarification, the VSV may be further purified on an anion exchange membrane adsorber. Membrane adsorber materials are well known to one of skill in the art and available from vendors such as Sartorius Corp. (Edgewood, N.Y.), Pall Corp. (East Hills, N.Y.) and Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Mo.). Exemplary anion exchange membrane adsorbers include, but are not

limited to a Sartobind™ Q membrane adsorber (Sartorius Corp.) and a Mustang™ Q membrane adsorber (Pall Corp.). In one particular embodiment, the anion exchange membrane adsorber is a Pall Mustang™ Q membrane adsorber. In general, methods and buffers known from conventional ion exchange chromatography can be directly applied to membrane adsorber chromatography, which are known to one of skill in the art. In certain embodiments, the anion exchange membrane adsorber chromatography is performed at room temperature, as defined above.

Thus, the VSV may be purified via an anion exchange membrane adsorber, wherein the VSV filtered solution from the secondary clarification is loaded onto the anion exchange membrane adsorber equilibrated with a first pH buffered salt solution (also referred to as an "equilibration buffer" or VSV "binding buffer"). The VSV is eluted from the anion exchange membrane adsorber with a second pH buffered salt solution ("the elution buffer") and the eluted VSV fractions are recovered (e.g., see U.S. Patent Publication 2007/0249019).

The first pH buffered salt solution or equilibration buffer may be an NaCl or KCL salt solution. The NaCl or KCl may be present in solution at an ionic strength between about at least 0.1 M to about 0.4 M, including fractional ionic strengths therebetween. The buffer solution may be a phosphate buffer, a N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer or a Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) buffer. These buffers may have a pH between about 6.0 to about 8.0.

The equilibration buffer may further comprise about 1% sucrose to about 5% sucrose. The second pH buffered salt solution (the "elution buffer") may also comprise the same buffering components as the first (equilibration) buffer. The elution buffer may further comprise about 1% sucrose to about 5% sucrose.

To elute the VSV from the membrane, the salt (NaCl or KCl) concentration (ionic strength) of the elution buffer may be increased by linear gradient or in a single step elution process (also described in U.S. Patent Publication 2007/0249019). Both steps are equally effective at eluting VSV from the anion exchange membrane adsorber. The ionic strength of the NaCl in the second pH buffered salt solution should be between 0.5 M to 0.75 M.

The ionic strength of the NaCl in the second pH buffered salt solution should be linearly increased from 0.001 M to 0.75 M at an elution flow rate of about 10 CV/minute to 30 CV/minute.

Tangential Flow Filtration (TFF)

Following VSV purification by anion exchange membrane adsorber chromatography, the VSV may be further purified by tangential flow filtration (TFF). In general, TFF is a pressure driven process that uses a membrane(s) to separate components in a liquid solution (or suspension), wherein a fluid (the feed flow) is pumped tangentially along the surface of the membrane and an applied pressure serves to force a "portion" of the fluid through the membrane to the filtrate side (of the membrane). TFF may be performed at room temperature. In this process, the buffer is exchanged and the VSV is concentrated. The TFF step may comprise concentrating the VSV recovered from the anion exchange membrane adsorption step at least 5 times, followed by at least one buffer exchange.

TFF materials (e.g., hollow fiber, spiral-wound, flat plate) and methods (e.g., ultrafiltration (UF), diafiltration (DF), microfiltration) are well known to one of skill in the art. The TFF membrane may have a 300 to 750 kDa molecular weight cutoff.

The buffer used in the buffer exchange of the TFF may be a phosphate buffer, HEPES buffer or TRIS buffer as described above. However, the buffer may have a concentration of about 5 mM to 15 mM, including mM concentrations therebetween. The buffer exchange buffer may further comprise 0.10 M to 0.20 M NaCl and 3.5% to 4.5% sucrose.

The VSV fractions from the anion exchange membrane adsorber purification may be pooled, and the pooled solution concentrated and the buffer exchanged by TFF using a hollow fiber TFF membrane cartridge with a molecular weight cut-off of about 750 kDa (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.; Piscataway, N.J.).

Filtration

In the method described in U.S. Patent Publication 2007/0249019, the last process step in virus purification is a final microfiltration of the VSV retentate from the TFF, wherein the retentate is filtered through a 0.2 to 0.25 micron filter, as described above for secondary clarification via microfiltration.

Recombinant or Genetically Modified Vesicular Stomatitis Virus (VSV)

The VSV, as described herein, may be obtained and purified from mammalian cell culture by employing any of the purification methods described above. By "improved purity" is meant that the purified VSV is at least 90.0% free of cell culture protein and nucleic acid contaminants and preferably 99.0% to 99.8% free of cell culture protein and nucleic acid contaminants.

In particular embodiments, the VSV purified from cell culture fluid of a mammalian cell culture by any of the processes described above is a recombinant or genetically modified and/or attenuated VSV. Methods of producing recombinant RNA viruses, such as VSV, are well known and referred to in the art as "rescue" or "reverse genetics" methods. Exemplary rescue methods for VSV include, but are not limited to, the methods described in U.S. Pat. No. 6,033,886 and U.S. Pat. No. 6,168,943, each incorporated herein by reference. Additional techniques for conducting rescue of viruses, such as VSV, are described in U.S. Pat. No. 6,673,572 and WO 2004/113517, which are hereby incorporated by reference.

The VSV may be a VSV of a specified serotype. In certain embodiments, the purified VSV is an Indiana serotype, a New Jersey serotype, an Isfahan serotype, a Chandipura serotype, or other vesiculoviruses. In certain embodiments the VSV may contain sequences from more than one such serotype.

VSV vectors (and immunogenic compositions thereof) often comprise one or more attenuating mutations within the VSV genome. In certain embodiments, the purified VSV has a genomic sequence comprising at least one mutation, which attenuates the pathogenicity of VSV. In other embodiments, the purified VSV has a genomic sequence comprising at least two mutations, which attenuate the pathogenicity of VSV. For example, an attenuated VSV may comprise two or more known attenuating mutations, such as the attenuating mutations set forth in International Application No. PCT/US2005/011499 (International Publication No. WO 2005/098009), and U.S. Patent Publication number 2007/0218078A1, incorporated herein by reference. For example, known VSV attenuating mutations include, but are not limited to, gene shuffling mutations (including gene shuffles of the VSV genes forming the VSV genome and designated N, P, M, G and L), G protein insertional mutations, G protein truncation mutations, temperature sensitive (ts) mutations (and other point mutations), non-cytopathic M gene mutations, G-stem mutations,

ambisense RNA mutations and gene deletion mutations, each of which are set forth in detail in International Publication No. WO 2005/098009. Thus, in certain embodiments, the purified VSV comprises one or more attenuating mutations, including, without limitation, a temperature-sensitive (ts) mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

In certain embodiments, the VSV purified by any of the purification processes described above has one or more mutations that result in virus attenuation, and one or more mutations that result in increased growth and an increase yield of virus from mammalian cells or cell lines. For example, the present invention provides a process or a method for adaptation of a highly attenuated VSV recombinant to tissue culture conditions by continuous passaging at low multiplicity of infection (MOI) in Vero cells or in any susceptible cell substrate. The multiple serial passaging process results in genotypic changes characterized by progressive accrual of a number of nucleotide (NT) substitutions throughout the viral genome. Most of these nucleotide substitutions result in amino acid (AA) substitutions in the VSV proteins. The process described herein resulted in phenotypic adaptation of the virus, accompanied by substantial improvements in virus yield. Passage in Vero cells was continued until genotypic and phenotypic stability was achieved, usually in 10 to 15 serial passages (P10 – P15). Further passaging of the virus beyond P15 showed few or no additional substitutions and did not result in further enhancement of virus yields. This process results in substantial improvement in manufacturing yield as well as enhanced manufacturing consistency. The adaptive mutations did not substantially affect the neurovirulence (NV) of the passaged virus when tested in the highly sensitive mouse intracranial NV animal model.

One embodiment of the invention provides an isolated, genetically modified vesicular stomatitis virus (VSV) having at least one amino acid mutation in a region corresponding to at least one of the following positions:

the amino acids at positions 119 or 142 of the M protein;

the amino acids at positions 109, 224, 438, 477, or 481 of the G protein; and

the amino acids at positions 205, 220 or 1450 of the L protein.

In certain embodiments, the mutation is at either position 119 or 142 of the M protein or is at both positions 119 and 142 of the M protein. In other certain embodiments, the mutation of the amino acid at position 119 of the M protein is a T→ N mutation and the mutation of the amino acid at position 142 of the M protein is a P → T mutation or a P → Q mutation.

In one embodiment, the mutation of the amino acids at position 109, 224, 438, 477 or 481 of the G protein is a K → N, N → T, S → I, A → V/G → L or V → I mutation, respectively.

In one embodiment, the mutation of the amino acid at position 205, 220 or 1450 of the L protein is P → L, K → E, or L → I, respectively.

In certain embodiments, the genetically modified and attenuated VSV as described herein has a genomic sequence comprising one or more foreign or heterologous (or foreign) polynucleotide sequences, such as a foreign RNA open reading frame (ORF). The heterologous polynucleotide sequences can vary as desired, and include, but are not limited to, a gene encoding a cytokine (such as an interleukin), a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor, a gene encoding a restriction marker, a gene encoding a therapeutic protein or a protein of a different microbial pathogen (e.g. virus, bacterium, parasite or fungus), especially proteins capable of eliciting desirable immune responses. For example, the heterologous polynucleotide sequences encoding a protein of a different microbial pathogen may be one or more of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a Vibrio cholerae gene, a Streptococcus pneumoniae gene, Streptococcus pyogenes gene, a Helicobacter pylori gene, a Streptococcus agalactiae gene, a Neisseria meningitidis gene, a Neisseria gonorrhoeae gene, a Corynebacterium diphtheriae gene, a Clostridium tetani gene, a Bordetella pertussis gene, a Haemophilus gene, a Chlamydia gene, and a Escherichia coli gene. In certain

embodiments, the purified VSV comprises an HIV gene sequence, wherein the HIV sequence is selected from the group consisting of gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev or vpu. In one specific embodiment, the HIV gene is gag or env.

In certain other embodiments, the purified VSV contains both at least one attenuating mutation and at least one heterologous protein as described above. In other certain embodiments, the VSV immunogenic composition is a genetically modified VSV comprising two attenuating mutations and an orf encoding the HIV-1 gag protein. In one embodiment, the genetically modified VSV further comprises a nucleic acid molecule encoding the HIV gag protein, wherein the HIV gag protein has a mutation in at least one of the amino acids at position 165, 270, 329 or 348, wherein the mutation is S → G, L → S, D → N or T → K, respectively.

In other embodiments, the genetically modified VSV described herein encodes the HIV gag gene, wherein the gag gene is inserted into the VSV genome at position one (3'-gag_1-NPMGL-5'), position two (3'-N-gag_2-PMGL-5'), position three (3'-NP-gag_3-MGL-5'), position four (3'-NPM-gag_4-GL-5'), position five (3'-NPMG-gag_5-L-5') or position six (3'-NPMGL-gag_6-5'). In other embodiments, the VSV described herein encodes the HIV env gene, wherein the env gene is inserted into the VSV genome at position one (3'-env_1-NPMGL-5'), position two (3'-N-env_2-PMGL-5'), position three (3'-NP-env_3-MGL-5'), position four (3'-NPM-env_4-GL-5'), position five (3'-NPMG-env_5-L-5') or position six (3'-NPMGL-env_6-5').

One of skill in the art would understand from the above description that a variety of genetic modifications in the VSV genome occurred during serial passage of the virus at low MOI in cell culture. These genetic modifications resulted in an increase in viral yield from infected cells. Moreover, there were no other genotypic or phenotypic changes to the virus and no alterations in virus attenuation. These genetic modifications proved to be of significant benefit in terms of increasing the viral yield to a level useful for scale-up in viral vector production.

The invention described hereinafter addresses a need in the art for vesicular stomatitis virus (VSV) vectors having significantly attenuated pathogenicity in mammals, particularly attenuated neuropathogenicity as revealed in animal neurovirulence models. As described above, VSV has many characteristics, which make it a suitable vector for immunogenic compositions. For example, VSV infection of humans is uncommon and is either asymptomatic or characterized by mild flu-like

symptoms that resolve in three to eight days without complications, and as such, VSV is not considered a human pathogen. Other characteristics of VSV that render it an attractive vector include: (a) the ability to replicate robustly in cell culture; (b) the inability to either integrate into host cell DNA or undergo genetic recombination; (c) the existence of multiple serotypes, allowing the possibility for prime-boost immunization strategies; (d) foreign genes of interest can be inserted into the VSV genome and expressed abundantly by the viral transcriptase; (e) the development of a highly specialized system for the rescue of infectious virus from a cDNA copy of the virus genome (U.S. Patent 6,033,886; U.S. Patent 6,168,943) and (f) pre-existing immunity to VSV in the human population is infrequent.

Attenuated Vesicular Stomatitis Viruses

In certain embodiments, an attenuated VSV for use in the present invention comprises one or more mutations from the classes of mutations listed below. Moreover, these attenuated viruses are further genetically modified using the methods of the present invention, eg. serial passage for about 5 to 15 times using a low MOI. This method results in retention of the attenuated genotype and phenotype, yet provides for further genetic modifications as described herein, which result in a VSV that is better adapted for growth in cell culture. The higher virus yields achieved by use of these viruses makes them excellent candidates for vector production.

A. Vesicular Stomatitis Virus Mutation Classes

In one embodiment, a genetically modified VSV vector of the invention comprises at least two different classes of mutations in its genome. As noted previously, the terms "mutation class", "mutation classes" or "classes of mutation" are used interchangeably, and refer to mutations known in the art, when used singly, to attenuate VSV. For example, a "mutation class" of the invention includes, but is not limited to, a VSV temperature-sensitive N gene mutation (hereinafter, "$N_{(ts)}$"), a temperature-sensitive L gene mutation (hereinafter, "$L_{(ts)}$"), a point mutation, a G-stem mutation (hereinafter, "$G_{(stem)}$"), a non-cytopathic M gene mutation (hereinafter, "$M_{(ncp)}$"), a gene shuffling or rearrangement mutation, a truncated G gene mutation (hereinafter, "$G_{(ct)}$"), an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation, a

gene deletion mutation and the like. As defined hereinafter, a "mutation" includes mutations known in the art as insertions, deletions, substitutions, gene rearrangement or shuffling modifications.

Furthermore, as noted previously, the term "synergistic" attenuation refers to a level of VSV attenuation, which is greater than additive. For example, a synergistic attenuation of VSV comprises combining at least two classes of mutation in the same VSV genome, thereby resulting in a reduction of VSV pathogenicity much greater than an additive attenuation level observed for each VSV mutation class alone. Thus, in certain embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} at least greater than the additive attenuation level observed for each mutation class alone (*i.e.*, the sum of the two mutation classes), wherein attenuation levels (*i.e.*, the LD_{50}) are determined in a small animal neurovirulence model.

By way of a non-limiting example, if equation (1) describes an "additive attenuation" of VSV:

$$(1) \qquad \Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50} = x_{LD50};$$

wherein Δa_{LD50} is the LD_{50} of a VSV having a first mutation class in its genome, Δb_{LD50} is the LD_{50} of a VSV having a second mutation class in its genome and x_{LD50} is the sum of Δa_{LD50} and Δb_{LD50}; then a VSV "synergistic attenuation" of the invention, having a LD_{50} at least greater than the additive attenuation level observed for each mutation class alone, is described by equation (2):

$$(2) \qquad \Delta a,b_{LD50} > (\Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50});$$

wherein $\Delta a,b_{LD50}$ is the LD_{50} of a VSV having a combination of two mutation classes in its genome, Δa_{LD50} is the LD_{50} of a VSV having a first mutation class in its genome and Δb_{LD50} is the LD_{50} of a VSV having a second mutation class in its genome. Thus, in certain embodiments, the synergy of VSV attenuation (*i.e.*, two mutation classes in the same VSV genome) is described relative to the LD_{50} of two VSV constructs (each VSV construct having a single mutation class in its genome), wherein the synergistic attenuation of the VSV having two mutation classes in its genome is defined as a LD_{50} at least greater than the additive LD_{50} of the two VSV constructs having a single mutation class in their genome.

In certain other embodiments, the synergy of VSV attenuation is described relative to the LD_{50} of a wild-type VSV. Thus, in one embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least greater than the LD_{50} of wild-

type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In one embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 10-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In another embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 100-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In another embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 1,000-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In yet other embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 10,000-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In certain other embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 100,000-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. The determination of a 50% lethal dose (LD_{50}) for a particular VSV vector is readily determined by a person of skill in the art using known testing methods and animal models.

Gene Shuffling Mutations

In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a gene shuffling mutation in its genome. As defined herein, the terms "gene shuffling", "shuffled gene", "shuffled", "shuffling", "gene rearrangement" and "gene translocation" are used interchangeably, and refer to a change (mutation) in the order of the wild-type VSV genome. As defined herein, a wild-type VSV genome has the following gene order: 3′-NPMGL-5′.

It is known in the art, that the position of a VSV gene relative to the 3′ promoter determines the level of expression and virus attenuation (U.S. Patent 6,596,529 and Wertz *et al.*, 1998, each specifically incorporated herein by reference). There is a gradient of expression, with genes proximal to the 3' promoter expressed more abundantly than genes distal to the 3' promoter. The nucleotide sequences encoding VSV G, M, N, P and L proteins are known in the art (Rose and Gallione, 1981; Gallione *et al.*, 1981). For example, U.S. Patent 6,596,529 describes gene shuffling mutations in which the gene for the N protein is translocated (shuffled) from its wild-type promoter-proximal first position to successively more distal positions on the

genome, in order to successively reduce N protein expression (*e.g.*, 3′-PNMGL-5′, 3′-PMNGL-5′, 3′-PMGNL-5′, referred to as N2, N3 and N4, respectively). Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV comprises a gene shuffling mutation in its genome. In one class of mutation, in one particular embodiment, a genetically modified VSV comprises a gene shuffling mutation comprising a translocation of the N gene (*e.g.*, 3′-PNMGL-5′ or 3′-PMNGL-5′).

It should be noted herein, that the insertion of a foreign nucleic acid sequence (*e.g.,* HIV *gag*) into the VSV genome 3′ to any of the N, P, M, G or L genes, effectively results in a "gene shuffling mutation" as defined above. For example, when the HIV *gag* gene is inserted into the VSV genome at position one (*e.g.*, 3′-gag_1-NPMGL-5′), the N, P, M, G and L genes are each moved from their wild-type positions to more distal positions on the genome. Thus, in certain embodiments of the invention, a gene shuffling mutation includes the insertion of a foreign nucleic acid sequence into the VSV genome 3′ to any of the N, P, M, G or L genes (*e.g.*, 3′-gag_1-NPMGL-5′, 3′-N-gag_2-PMGL-5′, 3′-NP-gag_3-MGL-5′, *etc.*)

G Protein Insertion and Truncation Mutants

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutated G gene, wherein the encoded G protein is truncated at its cytoplasmic domain (carboxy-terminus), also referred to as the "cytoplasmic tail region" of the G protein. It is known in the art that G gene mutations which truncate the carboxy-terminus of the cytoplasmic domain influence VSV budding and attenuate virus production (Schnell, et al. The EMBO Journal 17(5):1289-1296, 1998; Roberts, et al. J Virol, 73:3723-3732, 1999). The cytoplasmic domain of wild-type VSV G protein comprises twenty-nine amino acids (RVGIHLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK-COOH; SEQ ID NO:1).

In certain embodiments, a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein in which the last twenty-eight carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted (retaining only arginine from the twenty-nine amino acid wild-type cytoplasmic domain of SEQ ID NO:1). In certain other embodiments, a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein in which the last twenty carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted (relative to the twenty-nine amino acid wild-type cytoplasmic domain of SEQ ID NO:1).

In certain other embodiments, a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein comprising a single amino acid in its cytoplasmic domain (cytoplasmic tail region), wherein the single amino acid is any naturally occurring amino acid. In still other embodiments, a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein comprising nine amino acids in its cytoplasmic domain (cytoplasmic tail region), wherein the nine amino acids are any naturally occurring amino acids. In certain other embodiments, a mutated VSV gene of the invention encodes a G protein containing an insertion representing a foreign epitope. Such mutants are known in the art (*e.g., see* Schlehuber and Rose, 2003).

As defined herein, a G gene mutant encoding a G protein in which the last twenty-eight carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted, relative to the wild-type sequence of SEQ ID NO:1, is designated "$G_{(ct-1)}$", or simply as "CT1", wherein the cytoplasmic domain of the $G_{(ct-1)}$ has an amino acid sequence of (R-COOH). As defined herein, a G gene mutant encoding a G protein in which the last twenty carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted, relative to the wild-type sequence of SEQ ID NO:1, is designated "$G_{(ct-9)}$", wherein the cytoplasmic domain of the $G_{(ct-9)}$, or simply as "CT9", has an amino acid sequence of (RVGIHLCIK-COOH; SEQ ID NO:2). Thus, in certain embodiments of the invention, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutated G gene, wherein the encoded G protein is a $G_{(ct-1)}$ or $G_{(ct-9)}$.

Temperature Sensitive and Other Point Mutations

A VSV "temperature-sensitive" ("ts") mutation, as defined hereinafter, is a mutation in the VSV genome which restricts VSV growth at a non-permissive temperature. For example, a VSV ts mutant of the invention grows normally and to high titer at the permissive temperature (*e.g.*, 31°C), but their growth or reproduction is restricted at non-permissive temperatures (*e.g.*, 37°C or 39°C). The generation of ts mutants by chemical and site directed mutagenesis are well known in the art (*e.g.*, *see* Pringle, 1970; Li *et al.*, 1988); and numerous ts mutants have been characterized and described (*e.g., see* Flamand and Pringle, 1971; Flamand and Bishop, 1973; Printz and Wagner, 1971; Gopalakrishna and Lenard, 1985; Pringle *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1988; Rabinowitz *et al.*, 1977; Lundh *et al.*, 1988; Dal Canto *et al.*, 1976; Rabinowitz *et al.*, 1976). In certain embodiments, a genetically

modified VSV of the invention comprises a ts mutation in its genome, wherein the ts mutation is one or more mutations of a nucleic acid sequence encoding the G, M, N, P or L protein.

As defined herein, a ts mutation of any one the VSV G, M, N, P or L genes is a separate "mutation class" of the invention. For example, in certain embodiments of the invention, a genetically modified VSV comprising at least two different classes of mutations in its genome (wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity) comprises one or more ts N gene mutation(s) (hereinafter, "$N_{(ts)}$") as a first class of mutation and one or more ts L gene mutation(s) (hereinafter, "$L_{(ts)}$") as a second class of mutation. As a non-limiting example, a genetically modified VSV comprising a genome such as 3′-$N_{(ts)}$PMG$L_{(ts)}$-5′ comprises two classes of mutations (*i.e.*, (1) an $N_{(ts)}$ gene mutation and (2) an $L_{(ts)}$ gene mutation) and a genetically modified VSV comprising a genome such as 3′-gag_1-$N_{(ts)}$PMG$L_{(ts)}$-5′ comprises three classes of mutations (i.e., (1) an $N_{(ts)}$ gene mutation, (2) an $L_{(ts)}$ gene mutation and (3) by way gag_1 insertion, a gene shuffling mutation).

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a point mutation in its genome, wherein the point mutation is one or more mutations of a nucleic acid sequence encoding the G, M, N, P or L protein, wherein the mutation confers an attenuating phenotype such as cold-adaptation, decreased fusion or cytopathogenic efficiency (*e.g., see* Fredericksen and Whitt, 1998; Ahmed and Lyles, 1997). For example, Fredericksen and Whitt (1998) describe three attenuating point mutations of the G gene (*e.g.*, D137-L, E139-L or DE-SS) which have a shifted pH threshold for fusion activity. Ahmed and Lyles (1997) described an attenuating point mutation of the M gene (N163D) that was highly defective in inhibition of host gene expression and was turned over more rapidly than wild-type M protein. Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises one or more point mutations in its genome.

Non-Cytopathic M Gene Mutations

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a non-cytopathic mutation in the M gene. The VSV (Indiana serotype) M gene encodes a 229 amino acid M (matrix) protein, wherein the first thirty amino acids of the NH_2-terminus comprise a PPPY motif. It was demonstrated by Jayakar

et al. (J. Virology, 74: 9818-27, (2000)), that mutations in the PPPY motif (*e.g.*, APPY, AAPY, PPAY, APPA, AAPA and PPPA) reduce virus yield by blocking a late stage in virus budding. Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a non-cytopathic mutation in the M gene, wherein the mutation is in the PPPY motif of the encoded M protein.

It has recently been reported that the M mRNA further encodes two additional proteins, referred to as M2 and M3 (Jayakar and Whitt, J. Virology, 76:8011-18, 2002). The M2 and M3 proteins are synthesized from downstream methionines in the same reading frame that encodes the 229 amino acid M protein (referred to as M1), and lack the first thirty-two (M2 protein) or fifty (M3 protein) amino acids of the M1 protein. It has been observed that cells infected with a recombinant VSV that expresses the M protein, but not M2 and M3, exhibit a delayed onset of cytopathic effect (in certain cell types), yet produce a normal virus yield. Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a non-cytopathic mutation in the M gene, wherein the M gene mutation results in a virus that does not express the M2 or M3 protein (*e.g., see* Jayakar and Whitt, 2002).

G-Stem Mutations

In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutation in the G gene, wherein the encoded G protein has a mutation in the membrane-proximal stem region of the G protein ectodomain, referred to as G-stem protein. The G-stem region comprises amino acid residues 421 through 462 of the G protein. Recent studies have demonstrated the attenuation of VSV *via* insertion and/or deletion (*e.g.*, truncation) mutations in the G-stem of the G protein (Robinson and Whitt, J. Virol., 74, 2239-46, 2000; Jeetendra *et al.*, J. Virol, 76, 12300-311, 2002; Jeetendra *et al.*, J. Virol, 77, 12807-18, 2003). Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV comprises a G-stem insertion, deletion, substitution or a combination thereof. In one particular embodiment, a genetically modified VSV vector of the invention comprising a G-stem mutation (and immunogenic compositions thereof), comprises a genome of 3′-gag_1-$NPMG_{(stem)}L$-5′.

Ambisense RNA Mutations

In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises an ambisense RNA mutation, in which the 5′ antigenome promoter (AGP) is replaced with a copy of the 3′ genome promoter (GP). The 5′ AGP of VSV, as well as other nonsegmented, negative strand RNA viruses, acts as a strong replication promoter while the 3′ GP acts as a transcription promoter and a weak replication promoter. In the normal course of VSV infection, there is a 3- to 4-fold predominance of genome copies over antigenome copies; this ratio is even higher for rabies virus, another member of the Rhabdovirus family (Finke and Conzelmann, J. Virology, 73(5):3818-25, 1999). Previous work with rabies virus demonstrated that replacing the 5′ AGP with a copy of the GP (known as an ambisense RNA mutation) led to equal levels of genome and antigenome RNA copies within infected cells. In addition, a foreign gene was expressed from the copy of the GP placed at the 5′ end of the genome. When serially passaged in cultured cells, the rabies virus containing the ambisense RNA mutation consistently replicated to 10- to 15-fold lower titers than a recombinant wild type rabies virus (Finke and Conzelmann, J. Virology, 73(5):3818-25, 1999). Such a mutation is used in VSV vectors to both attenuate the virus replication and express foreign genes. Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV comprises an ambisense RNA mutation.

Gene Deletions

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a virus in which a VSV gene (such as G or M) is deleted from the genome. For example, Roberts *et al.* (J. Virol., 73, 3723-32, 1999) described a VSV vector in which the entire gene encoding the G protein was deleted (ΔG) and substituted with influenza haemagglutinin (HA) protein, wherein the VSV vector (ΔG-HA) demonstrated attenuated pathogenesis.

B. Methods for Generating Further Genetic Modifications of Attenuated VSV

In certain embodiments, the invention is directed to a genetically modified VSV comprising at least two different classes of mutations set forth below. Any of these genetically modified and attenuated VSV may be further genetically modified by the methods described in the present invention. That is, any of these attenuated VSV

may be serially passaged in susceptible cells or cell lines for about 5 to 15 times at a low multiplicity of infection ranging from about 0.001 to about 0.1 PFU per cell and their genomes analyzed for the presence of at least one of the mutations described herein.

Accordingly, in one aspect of the invention, a method is provided for adapting a virus for growth in cell culture comprising the following steps:

a) infecting the cell culture with the virus at a low multiplicity-of-infection (MOI) ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU) per cell;

b) harvesting the cell culture medium containing the virus;

c) clarifying the cell culture medium;

d) freezing the cell culture medium; and

e) repeating steps a) through d) for about 5 to about 15 times.

The use of this method results in a 5 to 100 fold increase in virus production/yield and an increase in the stability of the virus genotype and phenotype characteristics, as compared to the virus production or yield using the VSV that has not been passaged at a low MOI for about 5 to 15 times at a low MOI of about 0.001 to about 0.1 PFU per cell.

The use of such method results in a genetically modified vesicular stomatitis virus (VSV) having at least one amino acid mutation in a region corresponding to at least one of the following positions:

the amino acids at positions 119 or 142 of the M protein;

the amino acids at positions 109, 224, 438, 477, or 481 of the G protein; and

the amino acids at positions 205, 220 or 1450 of the L protein.

In one embodiment, the genetically modified VSV produced by the methods of the invention has a mutation that comprises a conservative or non-conservative amino acid change.

In one embodiment, the genetically modified VSV produced by the methods of the invention has a mutation at either position 119 or 142 of the M protein or at both positions 119 and 142 of the M protein. In one embodiment, the mutation of the amino acid at position 119 of the M protein is a T→ N mutation and the mutation of

the amino acid at position 142 of the M protein is a P → T mutation or a P → Q mutation.

In one embodiment, the genetically modified VSV produced by the methods of the invention has a mutation of the amino acids at position 109, 224, 438, 477 or 481 of the G protein that is a K → N, N → T, S → I, A → V/G → L or V → I mutation, respectively.

In one embodiment, the genetically modified VSV produced by the methods of the invention has a mutation of the amino acid at position 205, 220 or 1450 of the L protein that is P → L, K → E, or L → I, respectively.

In one embodiment, the genetically modified VSV produced by the methods of the invention further comprises a nucleic acid molecule encoding the HIV gag protein, wherein the HIV gag protein has a mutation in at least one of the amino acids at position 165, 270, 329 or 348, wherein the mutation is S → G, L → S, D → N or T → K, respectively.

In one embodiment, the mutations noted above in the genetically modified VSV produced by the methods of the invention result in increased stability of the virus genotype and/or phenotype and further result in increased yield in virus production from a cell infected with the genetically modified VSV.

In one embodiment, the genetically modified VSV produced by the methods of the invention further comprises at least two other mutations in its genome, selected from any of those described above. In one embodiment, the mutations may be selected from the group consisting of a temperature-sensitive mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

In one embodiment, the methods described herein utilize a virus that is an attenuated virus. In one embodiment, the methods for producing the genetically modified virus is adapted for large scale production of a viral vector or immunogenic composition. In one embodiment, the method results in a 5 to 100 fold higher yield of virus compared to that obtained with a virus strain that has not been passaged for about 5 to 15 times at a low multiplicity of infection ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units per cell. In one embodiment, the method described above allows for maintaining any pre-existing mutation(s) associated with virus attenuation.

The pre-existing mutation(s) associated with virus attenuation may be selected from a temperature-sensitive mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation. In one embodiment, the method allows for maintaining a low neurovirulence profile associated with virus attenuation. In one embodiment, the attenuated virus used in the methods described above is a strain of vesicular stomatitis virus (VSV).

C. Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors

In certain embodiments, the invention provides a recombinant VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence inserted as a separate transcriptional unit into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication. This recombinant VSV vector may be further genetically modified to contain at least one of the modifications described above, which results in adaptation of the virus to growth in cell culture, thus increasing the yield of virus per cell.

Methods of producing recombinant RNA virus are referred to in the art as "rescue" or "reverse genetics" methods. Exemplary rescue methods for VSV are described in U.S. Patent 6,033,886, U.S. Patent 6,596,529 and WO 2004/113517, each incorporated herein by reference. The transcription and replication of negative-sense, single stranded, non-segmented, RNA viral genomes are achieved through the enzymatic activity of a multimeric protein complex acting on the ribonucleoprotein core (nucleocapsid). Naked genomic RNA cannot serve as a template. Instead, these genomic sequences are recognized only when they are entirely encapsidated by the N protein into the nucleocapsid structure. It is only in that context that the genomic and antigenomic terminal promoter sequences are recognized to initiate the transcriptional or replication pathways.

A cloned DNA equivalent of the VSV genome is placed between a suitable DNA-dependent RNA polymerase promoter (*e.g.*, the T7 RNA polymerase promoter) and a self-cleaving ribozyme sequence (*e.g.*, the hepatitis delta ribozyme), which is inserted into a suitable transcription vector (*e.g.*, a propagatable bacterial plasmid). This transcription vector provides the readily manipulable DNA template from which

the RNA polymerase (*e.g.*, T7 RNA polymerase) can faithfully transcribe a single-stranded RNA copy of the VSV antigenome (or genome) with the precise, or nearly precise, 5' and 3' termini. The orientation of the VSV genomic DNA copy and the flanking promoter and ribozyme sequences determine whether antigenome or genome RNA equivalents are transcribed. Also required for rescue of new VSV progeny are the VSV-specific trans-acting support proteins needed to encapsidate the naked, single-stranded VSV antigenome or genome RNA transcripts into functional nucleocapsid templates: the viral nucleocapsid (N) protein, the polymerase-associated phosphoprotein (P) and the polymerase (L) protein. These proteins comprise the active viral RNA-dependent RNA polymerase which must engage this nucleocapsid template to achieve transcription and replication.

Thus, a genetically modified and attenuated VSV of the invention, comprising at least two different classes of mutations in its genome (*e.g., see* Section A), is produced according to rescue methods known in the art. For example, a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome is generated using (1) a transcription vector comprising an isolated nucleic acid molecule which comprises a polynucleotide sequence encoding a genome or antigenome of a VSV and (2) at least one expression vector which comprises at least one isolated nucleic acid molecule encoding the trans-acting N, P and L proteins necessary for encapsidation, transcription and replication; in a host cell under conditions sufficient to permit the co-expression of these vectors and the production of the recombinant VSV. Any suitable VSV strain or serotype may be used according to the present invention, including, but not limited to, VSV Indiana, VSV New Jersey, VSV Chandipura, VSV Glasgow, and the like.

In addition to polynucleotide sequences encoding attenuated forms of VSV, the polynucleotide sequence may also encode one or more heterologous (or foreign) polynucleotide sequences or open reading frames (ORFs). The heterologous polynucleotide sequences can vary as desired, and include, but are not limited to, a co-factor, a cytokine (such as an interleukin), a T-helper epitope, a CTL epitope, a restriction marker, an adjuvant, or a protein of a different microbial pathogen (*e.g.* virus, bacterium, parasite or fungus), especially proteins capable of eliciting desirable immune responses. In certain embodiments, a heterologous ORF contains an HIV gene (*e.g., gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev or vpu*). In one particular embodiment,

the HIV gene is *gag*, wherein the *gag* gene is inserted into the VSV genome at position one (3′-gag_1-NPMGL-5′) or at position five (3′-NPMG-gag_5-L-5′). In another embodiment, the heterologous polynucleotide sequence further encodes a cytokine, such as interleukin-12, which are selected to improve the prophylactic or therapeutic characteristics of the recombinant VSV.

In certain embodiments, a genetically modified and attenuated VSV of the invention is mutated by conventional means, such as chemical mutagenesis. For example, during virus growth in cell cultures, a chemical mutagen is added, followed by: (a) selection of virus that has been subjected to passage at suboptimal temperature in order to select temperature-sensitive and/or cold adapted mutations, (b) identification of mutant virus that produce small plaques in cell culture, and (c) passage through heterologous hosts to select for host range mutations. In other embodiments, attenuating mutations comprise making predetermined mutations using site-directed mutagenesis and then rescuing virus containing these mutations. As set forth previously, a genetically modified VSV of the invention comprises at least two classes of mutation in its genome. In certain embodiments, one or more classes of mutation further comprises multiple mutations, such as a G-stem mutation class having a double mutation (*e.g.*, a deletion, insertion, substitution, *etc.*), a triple mutation and the like. These attenuated VSV vectors are then screened for attenuation of their virulence in an animal model.

The typical (although not necessarily exclusive) circumstances for rescue include an appropriate mammalian cell milieu in which T7 polymerase is present to drive transcription of the antigenomic (or genomic) single-stranded RNA from the viral genomic cDNA-containing transcription vector. Either co-transcriptionally or shortly thereafter, this viral antigenome (or genome) RNA transcript is encapsidated into functional templates by the nucleocapsid protein and engaged by the required polymerase components produced concurrently from co-transfected expression plasmids encoding the required virus-specific trans-acting proteins. These events and processes lead to the prerequisite transcription of viral mRNAs, the replication and amplification of new genomes and, thereby, the production of novel VSV progeny, *i.e.*, rescue.

The transcription vector and expression vector are typically plasmid vectors designed for expression in the host cell. The expression vector which comprises at

least one isolated nucleic acid molecule encoding the trans-acting proteins necessary for encapsidation, transcription and replication expresses these proteins from the same expression vector or at least two different vectors. These vectors are generally known from the basic rescue methods, and they need not be altered for use in the improved methods of this invention.

Additional techniques for conducting rescue of viruses such as VSV, are described in U.S. Patent 6,673,572 and U.S. Published Patent Application US20060153870, which are hereby incorporated by reference.

The host cells used in the rescue of VSV are those which permit the expression from the vectors of the requisite constituents necessary for the production of recombinant VSV. Such host cells can be selected from a prokaryotic cell or a eukaryotic cell, and preferably a vertebrate cell. In general, host cells are derived from a human cell, such as a human embryonic kidney cell (*e.g.*, 293). Vero cells, as well as many other types of cells are also used as host cells. The following are non-limiting examples of suitable host cells: (1) Human Diploid Primary Cell Lines (*e.g.* WI-38 and MRC5 cells); (2) Monkey Diploid Cell Line (*e.g.* FRhL-Fetal Rhesus Lung cells); (3) Quasi-Primary Continues Cell Line (*e.g.* AGMK-African green monkey kidney cells); (4) Human 293 cells and (5) other potential cell lines, such as, CHO, MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), primary chick embryo fibroblasts. In certain embodiments, a transfection facilitating reagent is added to increase DNA uptake by cells. Many of these reagents are known in the art (*e.g.*, calcium phosphate). Lipofectace (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and Effectene (Qiagen, Valencia, CA) are common examples. Lipofectace and Effectene are both cationic lipids. They both coat DNA and enhance DNA uptake by cells. Lipofectace forms a liposome that surrounds the DNA while Effectene coats the DNA but does not form a liposome. Alternatively, the plasmid DNA uptake can also be enhanced by electroporation of the cells, whereby a high voltage current is applied across cuvette containing cells and DNA for milliseconds.

The rescued attenuated VSV is then tested for its desired phenotype (temperature sensitivity, cold adaptation, plaque morphology, and transcription and replication attenuation), first by *in vitro* means. The mutations are also tested using a minireplicon system where the required trans-acting encapsidation and polymerase activities are provided by wild-type or modified helper viruses, or by plasmids

expressing the N, P and different L genes harboring gene-specific attenuating mutations. The attenuated VSV is also tested *in vivo* for synergistic attenuation in an animal neurovirulence model. For example, mouse and/or ferret models are established for detecting neurovirulence. Briefly, groups of ten mice are injected intra-cranially (IC) with each of a range of virus concentrations that span the anticipated LD_{50} dose (a dose that is lethal for 50% of animals). For example, IC inoculations with virus at 10^2, 10^3, 10^4 and 10^5 pfu are used where the anticipated LD_{50} for the virus is in the range 10^3-10^4pfu. Virus formulations are prepared by serial dilution of purified virus stocks in PBS. Mice are then injected through the top of the cranium with the requisite dose, in 50-100 μl of PBS. Animals are monitored daily for weight loss, morbidity and death. The LD_{50} for a virus vector is then calculated from the cumulative death of mice over the range of concentrations tested.

Heterologous Nucleic Acid Sequences and Antigens

In certain embodiments, the invention provides synergistically attenuated and genetically modified VSV (using the serial passage methods of the present invention at a low MOI) further comprising a foreign RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a site of the genome nonessential for replication, wherein the foreign RNA sequence (which is in the negative sense) directs the production of a protein capable of being expressed in a host cell infected by VSV. This recombinant genome is originally produced by insertion of foreign DNA encoding the protein into the VSV cDNA. In certain embodiments, any DNA sequence which encodes an immunogenic antigen, which produces prophylactic or therapeutic immunity against a disease or disorder, when expressed as a fusion or non-fusion protein in a recombinant synergistically attenuated VSV of the invention, alone or in combination with other antigens expressed by the same or a different VSV, is isolated and incorporated in the VSV vector for use in the immunogenic compositions of the present invention.

In certain embodiments, expression of an antigen by a synergistically attenuated and further genetically modified (using the methods of the invention) recombinant VSV induces an immune response against a pathogenic microorganism. For example, an antigen may display the immunogenicity or antigenicity of an antigen found on bacteria, parasites, viruses, or fungi which are causative agents of diseases

or disorders. In one embodiment, antigens displaying the antigenicity or immunogenicity of an antigen of a human pathogen or other antigens of interest are used.

To determine immunogenicity or antigenicity by detecting binding to antibody, various immunoassays known in the art are used, including but not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, immunoprecipitation reactions, agglutination assays (*e.g.*, gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, neutralization assays, *etc.* In one embodiment, antibody binding is measured by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by measuring binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay. In one embodiment for detecting immunogenicity, T cell-mediated responses are assayed by standard methods, *e.g.*, *in vitro* or *in vivo* cytotoxicity assays, tetramer assays, elispot assays or *in vivo* delayed-type hypersensitivity assays.

Parasites and bacteria expressing epitopes (antigenic determinants) that are expressed by synergistically attenuated VSV (wherein the foreign RNA directs the production of an antigen of the parasite or bacteria or a derivative thereof containing an epitope thereof) include but are not limited to those listed in Table 1.

In another embodiment, the antigen comprises an epitope of an antigen of a nematode, to protect against disorders caused by such worms. In another embodiment, any DNA sequence which encodes a Plasmodium epitope, which when expressed by a recombinant VSV, is immunogenic in a vertebrate host, is isolated for insertion into VSV (-) DNA according to the present invention. The species of Plasmodium which serve as DNA sources include, but are not limited to, the human malaria parasites *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale, P. vivax*, and the animal

malaria parasites *P. berghei, P. yoelii, P. knowlesi, and P. cynomolgi*. In yet another embodiment, the antigen comprises a peptide of the β-subunit of Cholera toxin.

Viruses expressing epitopes that are expressed by synergistically attenuated VSV (wherein the foreign RNA directs the production of an antigen of the virus or a derivative thereof comprising an epitope thereof) include, but are not limited to, those listed in Table 2, which lists such viruses by family for purposes of convenience and not limitation.

In specific embodiments, the antigen encoded by the foreign sequences that is expressed upon infection of a host by the attenuated VSV, displays the antigenicity or immunogenicity of an influenza virus hemagglutinin; human respiratory syncytial virus G glycoprotein (G); measles virus hemagglutinin or herpes simplex virus type-2 glycoprotein gD.

Table 1

Parasites and Bacteria Expressing Epitopes That can be expressed by VSV

PARASITES	BACTERIA
plasmodium spp.	*Vibrio cholerae*
Eimeria spp.	*Streptococcus pneumoniae*
Nematodes	*Streptococcus agalactiae*
Schistosoma	*Streptococcus pyogenes*
Leishmania	*Neisseria meningitidis*
	Neisseria gonorrhoeae
	Corynebacterium diphtheriae
	Staphylococcus aureus
	Staphylococcus epidermidis
	Clostridium tetani
	Bordetella pertussis

	Haemophilus spp. *(e.g., influenzae)*
	Chlamydia spp.
	Enterotoxigenic *Escherichia coli*
	Helicobacter pylori
	mycobacteria

Table 2

Viruses Expressing Epitopes that can be expressed by VSV

I. Picornaviridae
Enteroviruses
Poliovirus
Coxsackievirus
Echovirus
Rhinoviruses
Hepatitis A Virus
II. Caliciviridae
Norwalk group of viruses
III. Togaviridae and Flaviviridae
Togaviruses (*e.g.*, Dengue virus)
Alphaviruses
Flaviviruses (*e.g.*, Hepatitis C virus)
Rubella virus
IV. Coronaviridae
Coronaviruses
V. Rhabdoviridae

Rabies virus
VI. Filoviridae
Marburg viruses
Ebola viruses
VII. Paramyxoviridae
Parainfluenza virus
Mumps virus
Measles virus
Respiratory syncytial virus
Metapneumovirus
VIII. Orthomyxoviridae
Orthomyxoviruses (*e.g.*, Influenza virus)
IX. Bunyaviridae
Bunyaviruses
X. Arenaviridae
Arenaviruses
XI. Reoviridae
Reoviruses
Rotaviruses
Orbiviruses
XII. Retroviridae
Human T Cell Leukemia Virus type I
Human T Cell Leukemia Virus type II
Human Immunodeficiency Viruses (e.g., type I and type II
Simian Immunodeficiency Virus
Lentiviruses
XIII. Papovaviridae
Polyomaviruses
Papillomaviruses
XIV. Parvoviridae
Parvoviruses

XV. Herpesviridae
Herpes Simplex Viruses
Epstein-Barr virus
Cytomegalovirus
Varicella-Zoster virus
Human Herpesvirus-6
human herpesvirus-7
Cercopithecine Herpes Virus 1 (B virus)
XVI. Poxviridae
Poxviruses
XVIII. Hepadnaviridae
Hepatitis B virus
XIX. Adenoviridae

Other antigens that are expressed by attenuated VSV include, but are not limited to, those displaying the antigenicity or immunogenicity of the following antigens: Poliovirus I VP1; envelope glycoproteins of HIV I; Hepatitis B surface antigen; Diphtheria toxin; streptococcus 24M epitope, SpeA, SpeB, SpeC or C5a peptidase; and gonococcal pilin.

In other embodiments, the antigen expressed by the attenuated and further genetically modified VSV displays the antigenicity or immunogenicity of pseudorabies virus g50 (gpD), pseudorabies virus II (gpB), pseudorabies virus gIII (gpC), pseudorabies virus glycoprotein H, pseudorabies virus glycoprotein E, transmissible gastroenteritis glycoprotein 195, transmissible gastroenteritis matrix protein, swine rotavirus glycoprotein 38, swine parvovirus capsid protein, Serpulina hydodysenteriae protective antigen, Bovine Viral Diarrhea glycoprotein 55, Newcastle Disease Virus hemagglutinin-neuraminidase, swine flu hemagglutinin, or swine flu neuraminidase.

In certain embodiments, an antigen expressed by the attenuated and further genetically modified VSV displays the antigenicity or immunogenicity of an antigen derived from a canine or feline pathogen, including, but not limited to, feline leukemia virus, canine distemper virus, canine adenovirus, canine parvovirus and the like.

In certain other embodiments, the antigen expressed by the attenuated and further genetically modified VSV displays the antigenicity or immunogenicity of an antigen derived from Serpulina hyodysenteriae, Foot and Mouth Disease Virus, Hog Cholera Virus, swine influenza virus, African Swine Fever Virus, Mycoplasma hyopneumoniae, infectious bovine rhinotracheitis virus (*e.g.*, infectious bovine rhinotracheitis virus glycoprotein E or glycoprotein G), or infectious laryngotracheitis virus (*e.g.*, infectious laryngotracheitis virus glycoprotein G or glycoprotein I).

In another embodiment, the antigen displays the antigenicity or immunogenicity of a glycoprotein of La Crosse Virus, Neonatal Calf Diarrhea Virus, Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus, Punta Toro Virus, Murine Leukemia Virus or Mouse Mammary Tumor Virus.

In other embodiments, the antigen displays the antigenicity or immunogenicity of an antigen of a human pathogen, including but not limited to human herpesvirus, herpes simplex virus-1, herpes simplex virus-2, human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Varicella-Zoster virus, human herpesvirus-6, human herpesvirus-7, human influenza virus, human immunodeficiency virus (type 1 and/or type 2), rabies virus, measles virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, Plasmodium falciparum, and Bordetella pertussis.

Potentially useful antigens or derivatives thereof for use as antigens expressed by attenuated VSV are identified by various criteria, such as the antigen's involvement in neutralization of a pathogen's infectivity, type or group specificity, recognition by patients' antisera or immune cells, and/or the demonstration of protective effects of antisera or immune cells specific for the antigen.

In another embodiment, foreign RNA of the attenuated VSV directs the production of an antigen comprising an epitope, which when the attenuated VSV is introduced into a desired host, induces an immune response that protects against a condition or disorder caused by an entity containing the epitope. For example, the antigen can be a tumor specific antigen or tumor-associated antigen, for induction of a protective immune response against a tumor (*e.g.*, a malignant tumor). Such tumor-specific or tumor-associated antigens include, but are not limited to, KS 1/4 pan-carcinoma antigen; ovarian carcinoma antigen (CA125); prostatic acid phosphate; prostate specific antigen; melanoma-associated antigen p97; melanoma

antigen gp75; high molecular weight melanoma antigen and prostate specific membrane antigen.

The foreign DNA encoding the antigen, that is inserted into a non-essential site of the attenuated VSV DNA, optionally further comprises a foreign DNA sequence encoding a cytokine capable of being expressed and stimulating an immune response in a host infected by the attenuated VSV. For example, such cytokines include but are not limited to interleukins 1α, 1β, 2, 4, 5,6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 18, interferon-α, interferon-β, interferon-γ, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor and the tumor necrosis factors α and β.

Immunogenic and Pharmaceutical Compositions

In certain embodiments, the invention is directed to an immunogenic composition comprising an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity. The genetically modified VSV may be further adapted for growth in cell culture by passaging the virus for about 5 to 15 passages at a low MOI as described herein and this further genetically modified and attenuated VSV may be used to prepare the immunogenic compositions.

The synergistically attenuated and genetically modified VSV vectors of the invention are formulated for administration to a mammalian subject (*e.g.*, a human). Such compositions typically comprise the VSV vector and a pharmaceutically acceptable carrier. As used hereinafter the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the VSV vector, such media are used in the immunogenic compositions of the invention. Supplementary active compounds may also be incorporated into the compositions.

Thus, a VSV immunogenic composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral (*e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal) and mucosal (*e.g.,* oral, rectal, intranasal, buccal, vaginal, respiratory). Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH is adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier is a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (*e.g.,* glycerol, propylene glycol, and liquid polyetheylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity is maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms is achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, and the like. In many cases, it is preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions is brought

about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the VSV vector in the required amount (or dose) in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant (*e.g.*, a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer). Systemic administration can also be by mucosal or transdermal means. For mucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for mucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Mucosal administration is accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. The compounds are also prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In certain embodiments, it is advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used hereinafter refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

All patents and publications cited herein are hereby incorporated by reference.

The production of VSV vectored immunogenic compositions generally includes infecting a suitable cell culture (host) with recombinant VSV, growing VSV in cell culture, harvesting the cell culture fluid at the appropriate time and purifying the VSV from the cell culture fluid. The use of VSV vectors, and immunogenic compositions thereof, in clinical applications will require VSV samples (or doses) of appropriate purity in order to comply with safety regulations of the various drug safety authorities around the world (e.g., the Food and Drug Administration (FDA), the European Medicines Agency (EMEA), the Canadian Health Products and Food Branch (HPFB), etc.).

However, it is typically difficult to separate VSV from the cell culture contaminants (e.g., cell culture impurity proteins and DNA) and obtain VSV of appropriate purity and yield using the currently available VSV purification processes (e.g., purification via sucrose gradient centrifugation). For example, using the currently available purification processes, there is typically an inverse relationship between the purity and recovery (percent yield) of VSV samples, thereby making it difficult to manufacture sufficient quantities of purified VSV. Additionally, in today's bioreactor-based processes, increased cell concentrations and longer culture times result in higher VSV titers, with concomitant increases in cell debris and concentrations of organic constituents in the bioreactor fluid, further complicating VSV purification processes.

Sucrose gradient ultracentrifugation has been the standard method for virus purification (including VSV purification) since 1964 (Yamada et al., 2003 BioTechniques, 34(5):1074-1078, 1080; Brown et al., 1967 J. Immun., 99(1):171-7; Robinson et al., 1965 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 54(1):137-44; Nishimura et al., 1964 Japan. J. Med. Sci. Biol., 17(6):295-305). However, as virus concentrations increase, concomitant increases in cell debris, host DNA and protein impurities also occur, which are very difficult to remove at higher concentrations via sucrose gradient ultracentrifugation. In addition, sucrose gradient ultracentrifugation is extremely costly to scale-up. Concentration and purification of VSV by polyethylene glycol (PEG) precipitation (McSharry et al., 1970 Virol., 40(3):745-6) has similar problems of high impurity levels.

Relatively high quality virus has been obtained via size exclusion chromatography (Transfiguracion et al., 2003 Human Gene Ther., 14(12):1139-1153;

Vellekamp, et al., 2001 Human Gene Ther., 12(15):1923-36; Rabotti et al., 1971 Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Serie D: Sciences Naturelles, 272(2):343-6; Jacoli et al., 1968 Biochim. Biophys. Acta, Genl Subj., 165(2):99-302). However, due to process cost and operating difficulty, it is generally not feasible for large-scale virus production. Affinity chromatography, such as heparin (Zolotukhin et al., 1999 Gene Ther., 6(6):973-985), lectin (Kaarsnaes et al., 1983 J. Chromatog., 266:643-9; Kristiansen et al., 1976 Prot. Biol. Fluids, 23:663-5) and Matrex™ Cellufine™ sulfate (Downing et al., 1992 J. Virol. Meth., 38(2):215-228), has found some application in virus purification. Heparin and lectin are generally not preferred (or used) for cGMP virus production due to possible leaching problems, which would require additional tests prior to product release.

Affinity purification of virus using Matrex™ Cellufine™sulfate is an unresolved issue, due to efficiency of virus purification, virus quality and column regeneration. For VSV purification, very large affinity columns are needed (e.g., 0.2 L Matrex™ Cellufine. ™ sulfate resin per liter of cell culture; Wyeth Vaccine unpublished results). Low virus yield was observed when purified via ion exchange chromatography, either alone, or in combination with other types of traditional chromatographic techniques used in virus purification (International Patent Publication No. WO2006/011580; Specht et al., 2004 Biotech. Bioeng., 88(4):465-173; Yamada et al., 2003, cited above; Vellekamp et al., 2001 cited above; Zolotukhin et al., 1999, cited above; (International Patent Publication No. WO1997/06243; Kaarsnaes et al., 1983, cited above).

EXAMPLES

The following examples demonstrate certain aspects of the present invention. However, it is to be understood that these examples are for illustration only and do not purport to be wholly definitive as to conditions and scope of this invention. It should be appreciated that when typical reaction conditions (*e.g.*, temperature, reaction times, *etc.*) have been given, the conditions both above and below the specified ranges can also be used, though generally less conveniently. All parts and percents referred to herein are on a weight basis and all temperatures are expressed in degrees centigrade unless otherwise specified.

EXAMPLE 1: VIRUS PASSAGE STUDY WITH THE VSV INDIANA (IN) AND VSV NEW JERSEY (NJ) SEROTYPE

Figure 1 illustrates the genomic organization of *wt* VSV and *attn* VSVN4CT1-gag1. Figure 2 is an outline of the experimental protocol used to serially passage virus in Vero cells. The viruses at every fifth passage were analyzed by indicated assays. Figure 8A-8L shows the comparison of the nucleotide (NT) and amino acid (AA) sequences of original (passage 0 or P0) viruses and passage 25 of VSV Indiana serotype. The NT and AA substitutions in the passaged virus are shown in bold. Figure 9A through 9M shows the comparison of the nucleotide (NT) and amino acid (AA) sequences of original (passage 0 or P0) viruses and passage 25 of VSV New Jersey serotype. The NT and AA substitutions in the passaged virus are shown in bold. These sequences are summarized in Table 5 and in the sequence listing.

The attenuated $rVSV_{IN}$N4CT1Gag1 was used as the starting material for passaging in Vero stationary culture. Vero cells in T25 flasks were inoculated with the attenuated virus at a multiplicity of infection of 0.01 in DMEM (serum-free, antibiotic-free). The flasks were incubated at 32°C for 2 to 3 days when the viral cytopathic effect (CPE) was evident in 90-100% of the cell monolayers. The culture medium was harvested, clarified by low speed centrifugation (1500 rpm, 10 min). After addition of 1X Sucrose Phosphate (SP) buffer (final concentration), the clarified virus was flash-frozen in a dry-ice ethanol bath and stored at ≤ –60°C. This virus was labeled as passage 1 or P1 of $rrVSV_{IN}$N4CT1Gag. This virus was similarly used to inoculate fresh T25 flasks of Vero cells at moi of 0.01 to produce P2. This process, called serial passaging, was repeated 25 times to make P1 to P25 viruses. At each passage, the virus was titered by infectivity assay performed on a Vero monolayer.

Accrual of amino acid substitutions following serial passages using the VSVin serotype is shown in Figure 3. Growth kinetics of the passaged VSVin virus at MOI of 0.01 in Vero cells is shown in Figure 5.

Accrual of amino acid substitutions following serial passages using the VSVnj serotype is shown in Figure 4. Growth kinetics of the passaged VSVnj virus at MOI of 0.01 in Vero cells is shown in Figure 6.

EXAMPLE 2: PRODUCTION OF RECOMBINANT VSVN4CT1GAG1

The tissue culture-adapted San Juan strain of the VSV Indian serotype (VSVin) and its corresponding genomic cDNA were provided by Dr. John K. Rose of Yale University, New Haven, CT and were used in the derivation of the rVSVN4CT1gag1 recombinants.

A detailed procedure for preparation of rVSVinN4CT1gag1 plasmid DNA has been described earlier (Clarke et al., J Virology, 81, 2056-64, 2007 and Cooper et al., J Virology, 82:207-29, 2008). The analogous NJ serotype glycoprotein vector, rVSVnjN4CT1gag1 was generated by replacing the Gin gene with truncated form of the Gnj gene and has been described in Cooper et al, 2008. Figure 1 depicts schematically the order of viral genes within viral genomes for the attenuated VSV recombinants derived from wt VSV.

Infectious virus was recovered from genomic cDNA following transfection of Vero cells with the viral genome plasmid containing full-length genome and the five expression plasmids individually encoding the VSV N, P, L, M and G proteins. Expression from these plasmids is under the control of the T7 RNA polymerase promoter. The polymerase was supplied by electroporation of a plasmid encoding the T7 RNA polymerase under control of the human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer region. Rescued rVSV was purified by clonal isolation 3 to 4 times and amplified by passage in Vero cells 3 times. Virus rescue and all subsequent purification and amplification were performed in Vero cells. Fetal bovine serum (FBS) used in rescue of virus was of New Zealand origin. All steps after rescue were performed in serum-free medium (DMEM). All steps after clonal purification were performed in serum-free, antibiotic-free medium (DMEM).

Briefly, approximately 2.0×10^7 Vero cells from a T150 flask were placed in a tube containing 10 µg of the $rVSV_{IN}$N4CT1Gag1 full-length viral cDNA plasmid and five support plasmids encoding the VSV N, P, L, M, and G proteins under control of the T7 promoter (10, 4, 1, 1, 2µg, respectively). A seventh plasmid was added at 50 µg to supply T7 RNA polymerase; this plasmid is controlled by cellular RNA polymerase II. The suspension was subjected to electroporation and the cells were resuspended and transferred to a T150 flask. The flask was incubated at 37°C for 3 hours; heat shocked at 43°C for 5 hours and then incubated overnight at 37°C. Medium was replaced the following day and the flask was incubated at 32°C on the

second day. The flask was inspected each business day for signs of CPE. The flasks showing signs of CPE were followed until they achieved 80-100% CPE. At this point, the medium containing rescued virus (rescue supernatant) was harvested, supplemented with 1X SP[1] as a virus stabilizer, flash-frozen and stored at ≤ –60°C. All rescue supernatants were screened for Gag expression by Western blot analysis using Gag-specific monoclonal antibodies; the rescued viruses showing Gag expression were subjected to viral genomic sequencing. One or more viral clones of each serotype having correct sequences were chosen for further plaque purification and amplification.

The virus plaquing was performed on Vero cells in six-well plates with agar overlay in DMEM with Gentamicin and without serum. The rescue supernatant containing infectious virus was diluted in DMEM so as to achieve ≤ 5 plaques per well. A number of well-isolated plaques were picked, suspended in DMEM and subjected to two to three additional rounds of plaque purification. The lead plaque from the fourth cloning was picked and suspended in DMEM and was then used for three successive virus amplifications on Vero cells in 6-well plates, T25 flasks and T150 flasks, respectively. Amplification was performed using DMEM without serum and without antibiotics. The recombinant virus obtained by this processed was termed as low passage virus and was used for further passaging in Vero cells for cell adaptation as described below.

EXAMPLE 3: EXPERIMENTAL PROTOCOL FOR SERIAL PASSAGING

Low passage VSV recombinants (P0) for each serotype were passaged 25 successive times on Vero cell monolayer in T-25 flasks as shown in Figure 2. The Vero cells grown in serum-free medium were infected with virus at multiple of infection (MOI) of ~0.01 and incubated in 32°C /5% CO_2 incubator until extensive CPE is visible, usually in 48 to 72 hours post-infection. After each amplification, the virus culture was clarified by centrifugation at low speed and stabilized with 1X SP Sucrose phosphate buffer. The 10X SP contains per liter of potassium phosphate, dibasic, 12.2 gm; potassium phosphate, monobasic, 5.17 gm; sucrose, 746.2 gm). Virus cultures from passages 1 to 25 were titered by plaque assay as described earlier (Clarke et al., J. Virol., 81: 2056-64, 2007. Nucleotide sequencing was performed for every fifth passage.

EXAMPLE 4: MICE IC LD50 STUDY RESULTS

Mouse IC LD50 Studies

Young mice are highly sensitive to infection with VSV following intracranial inoculation (IC) causing rapid morbidity and mortality. The mouse IC LD50 neurovirulence animal model has been shown to be highly sensitive and capable of discriminating changes in virulence of VSV recombinants (Clarke et al, J. Virol., 81, 2056-64, 2007). Thus the mice receiving *wt* VSVin lost weight dramatically and died 2 to 4 days postinoculation with LD50 of 1 to 2 pfu. Viruses containing either CT truncations or gene shuffles, on the other hand, were shown to be more attenuated than the *wt* VSV with LD50 of 12 to 21 pfu (Clarke et al, J. Virol., 81, 2056-64, 2007). However, a dramatic decrease in virulence was seen when CT1 mutation was combined with gene shuffles (N4 and or gag1) mutations. For example, low passage rVSVinN4CT1gag1 exhibited extremely low level of virulence with LD50 of $>10^7$ pfu, the highest dose tested in this animal model. The mice inoculated with this virus initially lost 10 to 20% of their weight post inoculation, but recovered to normal weight in ~ 2 to 3 weeks. Similar results were seen with NJ serotype of the virus (Cooper et al., J Virology, 82, 207-29, 2008).

The Vero-adapted VSVN4CT1gag1 of this invention at passage 15 to 25 for each serotypes (IN and NJ) were tested in the murine IC LD50 animal model; no increase in virulence was seen, with LD50 of $>10^7$ pfu for all passaged viruses as shown in Figure 7. These results showed that the adaptive mutations accrued in viruses passaged in cell cultures did not impact on the virulence of the virus. The low virulence, along with their enhanced replication to high titers make the passaged viruses suitable for testing in human clinical trial.

Method

The experimental details for the mouse IC LD50 studies are given in Clarke et al. (Clarke et al, J. Virol., 81, 2056-64, 2007) and Cooper et al. (Cooper et al., J Virology, 82, 207-29, 2008). Five-week old female Swiss Webster mice were anesthetized and injected IC with 10-fold dilutions of virus in 30 µl volume (10 animals per dilution, with dilutions made to range around the anticipated LD50). Weight and health status were recorded daily for two weeks. Mice becoming either bilaterally paralyzed or showing significant signs of distress or severe illness were

sacrificed and recorded as succumbing to VSV disease. The LD50 was determined by the method of Reed and Muench, (Am. J. Hyg. 27, 493-97, 1938).

Summary

Compared to early passage rVSVN4CT1-gag1 viruses (P0), the serially passaged P15 viruses grew to much higher titers. This facilitated large scale manufacturing of clinical trial material (CTM). In addition, the stabilization of adaptive mutations by P15 provided viruses with manufacturing lot-to-lot consistency during CTM production. Moreover, the safety profile of the passaged viruses remained unchanged as tested by the murine IC LD50 animal model, thereby maintaining suitability for clinical evaluation.

EXAMPLE 5: SCALE-UP OF VECTORED HIV

A 10-L bioreactor (8-L working volume) containing Cytodex I microcarriers at 7.5 grams/L was inoculated with Vero cells at approximately 5 x 10^5 cells/mL. The bioreactor was perfused with 0.5 culture volumes per day of Gibco VP-SFM media (with or without phenol red) at 37°C. After 70-90 hours or when the cell density was ≥2 x 10^6 cells/mL, the culture was infected at an MOI of 0.001 at 32°C with either low-passage (≤P5) or high-passage (P15) VSV N4CT1-gag1 virus. The cultures were sampled 2-3 times daily and ultimately harvested at 48-60 hours post-infection.

Scaling-up the Indiana serotype to 10-liter bioreactors, both low-passage (≤P5) and high-passage (P15) virus was tested. Bioreactor runs X-BRN10-VSV-14, 17, and 28 were completed using low-passage virus material (solid lines) to infect the cultures. Bioreactor runs X-BRN10-VSV-31, 33 and 34 were completed using high-passage Research Virus Seed (dashed lines). The growth kinetics for each run are shown in figure 10. The passage number of the virus is indicated in brackets in the legend of the figure.

For both the high- and low-passage runs, each set of runs is consistent with each other. The high-passage bioreactor runs produced up to two logs higher titers than the low-passage runs. Based upon the growth kinetics of the high-passage material, the harvest time was determined to be approximately 48 hours post-infection.

Scaling-up the New Jersey serotype to 10-liter bioreactors, again both low-passage (≤P5) and high-passage (P15) virus was tested. Bioreactor runs X-BRN10-VSV-15, 18, 19, 20, 22 and 23 were completed using low-passage virus material (solid lines) to infect the cultures. Bioreactor runs X-BRN10-VSV-36, and 37 were completed using high-passage Research Virus Seed (dashed lines). The growth kinetics for each run is shown in figure 11.

There were fewer differences between low-passage and high-passage runs for the New Jersey construct than were observed for the Indiana construct. Based upon the growth kinetics of the high passage material, the harvest time for VSVnjN4CT1-gag1was determined to be approximately 48 hours post-infection, as was the case for VSVinN4CT1-gag1. In conclusion, the P15 N4CT1-gag1 resulted in ~35-fold increase in bioreactor titers and a 45-fold increase in the number of virus particles produced per cell for Indiana and ~5-fold increase in bioreactor titers and a 7-fold increase in the number of virus particles produced per cell for New Jersey. (See Tables 3 and 4)

Table 3: Comparison of VSVinN4CT1-gag1 Bioreactor Runs

Run ID	Number of Passages	Culture Volume (liters)	Cell Density @ Infection (cells/ml)	Time of Harvest (hpi)	Harvest Titer (pfu/ml @ 50 hpi)	Virus Particles Per Cell
BR-14	P1	8.0	2.96×10^6	48	1.20×10^8	0.4
BR-17	P2	8.0	3.07×10^6	50	2.55×10^8	0.8
BR-28	P3	7.0	2.78×10^6	47	1.84×10^8	0.7
BR-31	P16	8.0	2.25×10^6	88	8.51×10^7	37.8
BR-33	P16	8.0	2.24×10^6	50	4.50×10^7	20.1
BR-34	P16	8.0	1.99×10^6	51	7.10×10^7	35.7

Table 4 : Comparison of VSVnjN4CT1-gag1 Bioreactor Runs

Run ID	Number of Passages	Culture Volume (L)	Cell Density @ Infection (cells/mL)	Time of Harvest (hpi)	Peak Titer	Virus Particles Per Cell
BR-15	P1	8.0	3.52×10^6	72	5.28×10^6	1.5
BR-18	P3	8.0	3.06×10^6	72	1.72×10^7	5.6
BR-19	P3	7.0	3.36×10^6	66	1.46×10^7	4.3
BR-20	P3	7.0	3.65×10^6	66	7.26×10^6	2.0
BR-22	P4	7.0	4.27×10^6	50.5	3.41×10^7	8.0
BR-23	P4	7.0	2.78×10^6	47	1.07×10^7	3.9
BR-36	P16	8.0	2.42×10^6	72	5.57×10^7	23.0
BR-37	P16	8.0	2.31×10^6	50.3	8.36×10^7	36.2

Table 5	Sequence description for VSV Indiana and New Jersey strains after different passages (See Figures 8 and 9)
SEQ ID NO	DESCRIPTION
1	VSV Indiana (gag1) DNA: passage number 25
2	VSV Indiana (gag1) Protein: passage 0
3	VSV Indiana (gag1) Protein: passage number 25
4	VSV New Jersey (gag1) DNA: passage number 25
5	VSV New Jersey (gag1) Protein: passage 0
6	VSV New Jersey (gag1) Protein: passage number 25

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated, genetically modified vesicular stomatitis virus (VSV) having at least one amino acid mutation in a region corresponding to at least one of the following positions:

the amino acids at positions 119 or 142 of the M protein;

the amino acids at positions 109, 224, 438, 477, or 481 of the G protein; and

the amino acids at positions 205, 220 or 1450 of the L protein.

2. The genetically modified VSV of claim 1, wherein the nucleic acid encoding the genetically modified VSV further comprises a nucleic acid encoding at least one heterologous antigen, or a fragment thereof.

3. The genetically modified VSV of claim 1, wherein the one heterologous antigen, or a fragment thereof is from a pathogenic microorganism.

4. The genetically modified VSV of claim 3, wherein the pathogenic microorganism from which the nucleic acid encoding the heterologous antigen is obtained is selected from the group consisting of a virus, a bacterium, a protozoan and a fungus.

5. The genetically modified VSV of claim 4, wherein the heterologous antigen is selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV) antigen, an HTLV antigen, an SIV antigen, an RSV antigen, a PIV antigen, an HSV antigen, a CMV antigen, an Epstein-Barr virus antigen, a Varicella-Zoster virus antigen, a mumps virus antigen, a measles virus antigen, an influenza virus antigen, a poliovirus antigen, a rhinovirus antigen, a hepatitis A virus antigen, a hepatitis B virus antigen, a hepatitis C virus antigen, a Norwalk virus antigen, a togavirus antigen, an alphavirus antigen, a rubella virus antigen, a rabies virus antigen, a Marburg virus antigen, an Ebola virus antigen, a papilloma virus antigen, a polyoma virus antigen, a metapneumovirus antigen, a coronavirus antigen, a *Vibrio cholerae* antigen, a

Plasmodium falciparum antigen, a *Plasmodium vivax* antigen, a *Plasmodium ovale* antigen, a *Plasmodium malariae* antigen, a *Plasmodium knowlesi* antigen, a *Streptococcus pneumoniae* antigen, *Streptococcus pyogenes* antigen, a *Helicobacter pylori* antigen, a *Streptococcus agalactiae* antigen, a *Neisseria meningitidis* antigen, a *Neisseria gonorrhoeae* antigen, a *Corynebacterium diphtheriae* antigen, a *Clostridium tetani* antigen, a *Bordetella pertussis* antigen, a *Haemophilus* antigen, a *Chlamydia* antigen and an *Escherichia coli* antigen.

6. The genetically modified VSV of claim 5, wherein the heterologous antigen comprises an HIV protein.

7. The genetically modified VSV of claim 6, wherein the HIV protein is encoded by a gene selected from the group consisting of *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* and *vpu.*

8. The genetically modified VSV of claim 6, wherein the HIV protein is an HIV gag protein.

9. The genetically modified VSV of claim 8, wherein the HIV gag protein has at least one mutation at position 165, 270, 329, or 348.

10. The genetically modified VSV of any of claims 1 through 9, wherein the mutation comprises a conservative or non-conservative amino acid change.

11. The genetically modified VSV of claim 1, wherein the mutation is at either position 119 or 142 of the M protein or is at both positions 119 and 142 of the M protein.

12. The genetically modified VSV of claim 1, wherein the mutation of the amino acid at position 119 of the M protein is a T→ N mutation and the mutation of the amino acid at position 142 of the M protein is a P → T mutation.

13. The genetically modified VSV of claim 1, wherein the mutation of the amino acids at position 109, 224, 438, 477 or 481 of the G protein is a K → N, N → T, S → I, A → V/G → L, or V → I mutation, respectively.

14. The genetically modified VSV of claim 1, wherein the mutation of the amino acid at position 205, 220 or 1450 of the L protein is P → L, K → E, or L → I, respectively.

15. The genetically modified VSV of claim 9, wherein the mutation of amino acids at position 165, 270, 329 or 348 of the HIV gag protein is S → G, L → S, D → N or T → K, respectively.

16. The genetically modified VSV of any one of claims 1 through 15, wherein the mutation in any one or more of the amino acids results in increased stability of the virus genotype and/or phenotype.

17. The genetically modified VSV of claim 16, wherein the mutation of any one or more of the amino acids further results in increased yield in virus production from a cell infected with said virus.

18. The genetically modified VSV of any one of claims 1 through 15, further comprising at least two other mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a temperature-sensitive mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

19. A method for producing the genetically modified VSV of any one of claims 1 through 15, the method comprising serial passaging of a VSV in a continuous mammalian cell line at a low multiplicity of infection (MOI) ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU)/ml for at least 5-15 passages, wherein the virus has a titer of at least 1 x 10^6 PFU/ml and at least one or more of the mutations of any one of claims 1 through 14.

20. The method of claim 19, wherein the virus has a titer of at least 1 x 10^7 PFU/ml.

21. The method of either one of claims 19 or 20, wherein the cell line is a Vero, BHK, or 293 cell line.

22. The method of any one of claims 19 through 21, wherein the method results in a 5 to 100 fold higher yield of virus compared to that obtained with a virus strain that has not been passaged for about 5 to 15 times at a low MOI ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU)/cell.

23. The method of any one of claims 19 through 22, wherein the genetically modified VSV demonstrates an increase in stability of the virus genotype and/or phenotype.

24. An immunogenic composition comprising any one or more of the genetically modified VSV of any one of claims 1 through 15 and a pharmaceutically acceptable carrier.

25. The immunogenic composition of claim 24, further comprising an adjuvant.

26. A method for protecting a mammal against infection with a pathogenic microorganism, the method comprising administering an immunologically effective amount of the genetically modified VSV of any one of claims 1 through 15.

27. A method for protecting a mammal against infection with a pathogenic microorganism, the method comprising administering an immunologically effective amount of the immunogenic composition of either of claims 24 or 25.

28. A method for adapting a virus for growth in cell culture comprising

a. infecting the cell culture with the virus at a low multiplicity-of-infection (MOI) ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units (PFU) per cell;

b. harvesting the cell culture medium containing the virus;

c. clarifying the cell culture medium;

d. freezing the cell culture medium; and

e. repeating steps a) through d) for about 5 to about 15 times,

wherein the method results in a 5 to 100 fold increase in virus production/yield and an increase in the stability of the virus genotype and phenotype characteristics.

29. The method of claim 28, wherein the virus is an attenuated virus.

30. The method of claim 29, wherein the method allows for maintaining any pre-existing mutation(s) associated with virus attenuation.

31. The method of claim 29, wherein the method allows for maintaining a low neurovirulence profile associated with virus attenuation.

32. The method of claim 28, wherein the method is used for large scale production of an immunogenic composition.

33. The method of claim 32, wherein the method results in a 5 to 100 fold higher yield of virus compared to that obtained with a virus strain that has not been passaged for about 5 to 15 times at a low multiplicity of infection ranging from about 0.001 to about 0.1 plaque forming units per cell.

34. The method of claim 30, wherein the pre-existing mutation(s) associated with virus attenuation is selected from the group consisting of a temperature-sensitive mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

35. The method of claim 29, wherein the attenuated virus is a strain of vesicular stomatitis virus (VSV).

36. The method of claim 30, wherein the VSV has at least one amino acid mutation in a region corresponding to at least one of the following positions:

the amino acids at positions 119 or 142 of the M protein;

the amino acids at positions 109, 224, 438, 477, or 481 of the G protein; and

the amino acids at positions 205, 220 or 1450 of the L protein.

37. The method of claim 36, wherein the mutation comprises a conservative or non-conservative amino acid change.

38. The method of claim 36, wherein the mutation is at either position 119 or 142 of the M protein or is at both positions 119 and 142 of the M protein.

39. The method of claim 38, wherein the mutation of the amino acid at position 119 of the M protein is a T→ N mutation and the mutation of the amino acid at position 142 of the M protein is a P → T mutation.

40. The method of claim 36, wherein the mutation of the amino acids at position 109, 224, 438, 477 or 481 of the G protein is a K → N, N → T, S → I, (A → V / G→L), or V → I mutation, respectively.

41. The method of claim 36, wherein the mutation of the amino acid at position 205, 220 or 1450 of the L protein is P → L, K → E, or L → I, respectively.

42. The method of claim 35, wherein the strain of VSV is selected from the Indiana strain or the New Jersey strain or Isfahan serotype or other vesiculoviruses.

43. The method of either one of claims 36 or 42, wherein the strain of VSV contains a nucleic acid encoding at least one heterologous antigen.

44. The method of claim 43, wherein the heterologous antigen is obtained from a pathogenic microorganism selected from the group consisting of a virus, a bacterium, a protozoan and a fungus.

45. The method of claim 43, wherein the heterologous antigen is selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV) antigen, an HTLV antigen, an SIV antigen, an RSV antigen, a PIV antigen, an HSV antigen, a CMV antigen, an Epstein-Barr virus antigen, a Varicella-Zoster virus antigen, a mumps virus antigen, a measles virus antigen, an influenza virus antigen, a poliovirus antigen, a rhinovirus antigen, a hepatitis A virus antigen, a hepatitis B virus antigen, a hepatitis C virus antigen, a Norwalk virus antigen, a togavirus antigen, an alphavirus antigen, a rubella virus antigen, a rabies virus antigen, a Marburg virus antigen, an Ebola virus antigen, a papilloma virus antigen, a polyoma virus antigen, a metapneumovirus antigen, a coronavirus antigen, a *Vibrio cholerae* antigen, a *Plasmodium falciparum* antigen, a *Plasmodium vivax* antigen, a *Plasmodium ovale* antigen, a *Plasmodium malariae* antigen, a *Plasmodium knowlesi* antigen, a *Streptococcus pneumoniae* antigen, *Streptococcus pyogenes* antigen, a *Helicobacter pylori* antigen, a *Streptococcus agalactiae* antigen, a *Neisseria meningitidis* antigen, a *Neisseria gonorrhoeae* antigen, a *Corynebacterium diphtheriae* antigen, a *Clostridium tetani* antigen, a *Bordetella pertussis* antigen, a *Haemophilus* antigen, a *Chlamydia* antigen, and an *Escherichia coli* antigen.

46. The method of claim 43, wherein the heterologous antigen comprises an HIV protein.

47. The method of claim 46, wherein the HIV protein is encoded by a gene selected from the group consisting of *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* and *vpu.*

48. The method of claim 46, wherein the HIV protein is an HIV gag protein.

49. The method of claim 48, wherein the HIV gag protein has at least one mutation at position 165, 270, 329 or 348.

50. The method of claim 49, wherein the mutation of the amino acid at position 165, 270, 329 or 348 of the HIV gag protein is S → G, L → S, D → N, or T → K, respectively.

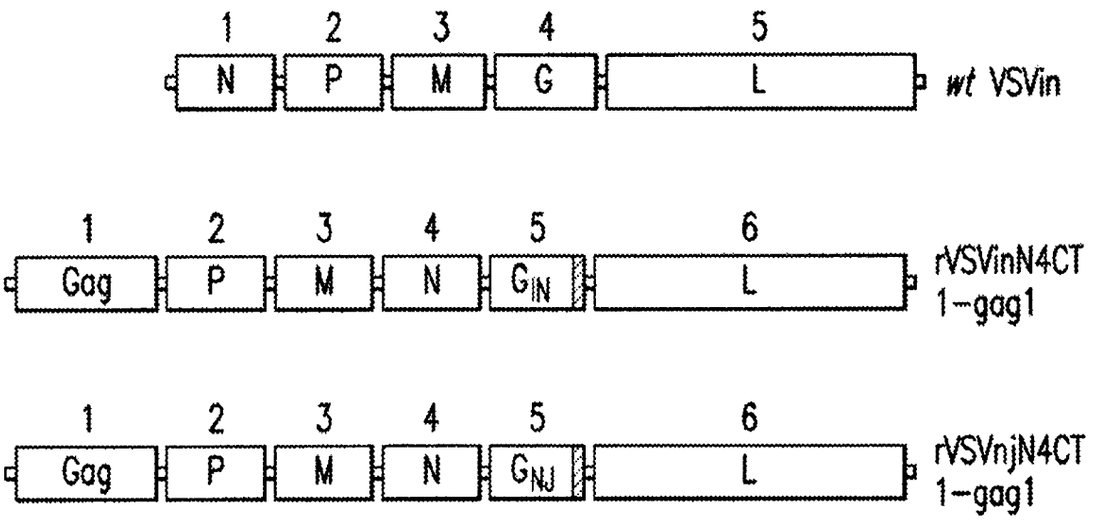

1
2
3
4
5
N
P
M
G
L
wt VSVin
1
2
3
4
5
6
Gag
P
M
N
G_{IN}
L
rVSVinN4CT
1-gag1
1
2
3
4
5
6
Gag
P
M
N
G_{NJ}
L
rVSVnjN4CT
1-gag1

FIG. 1

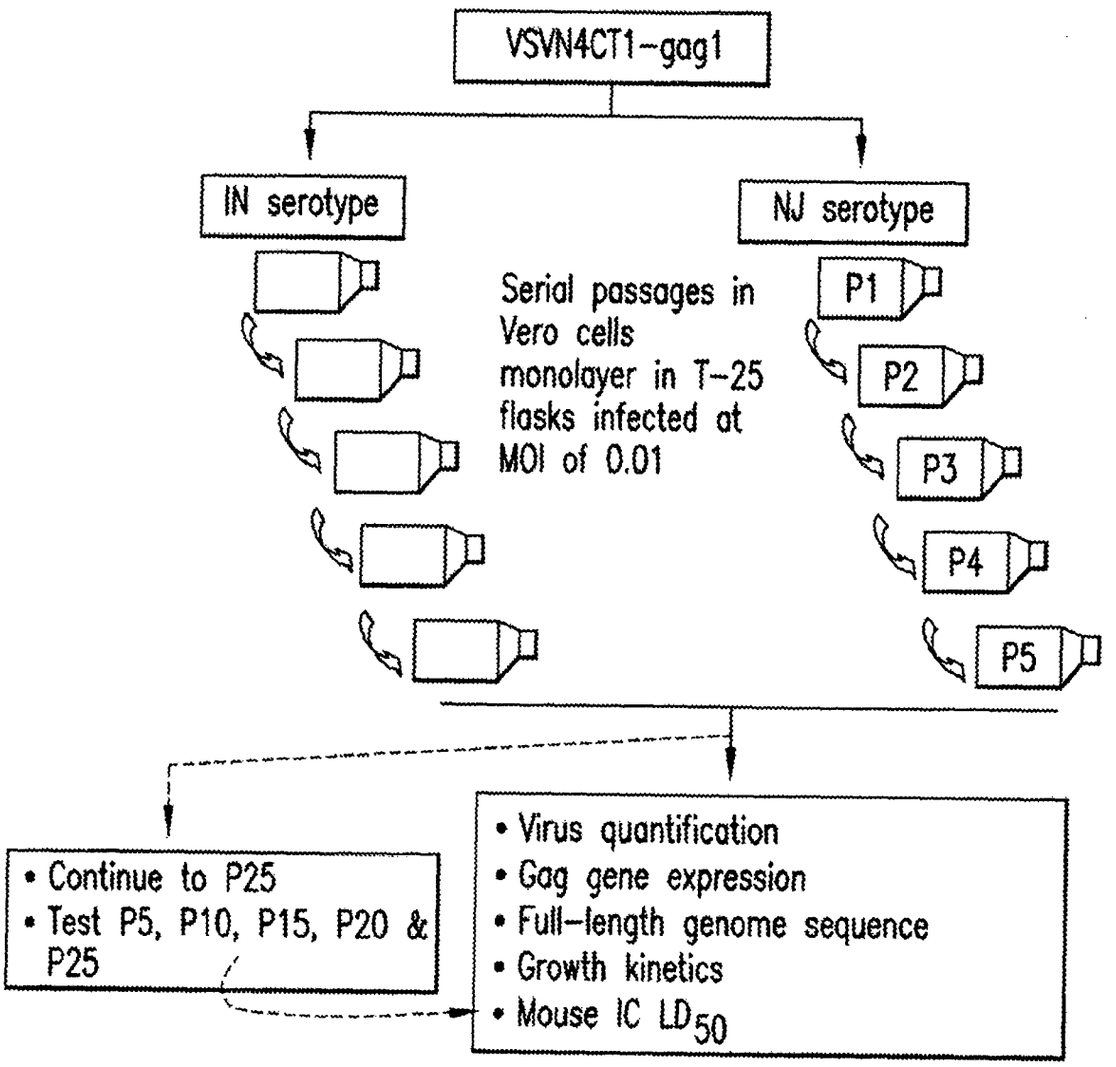
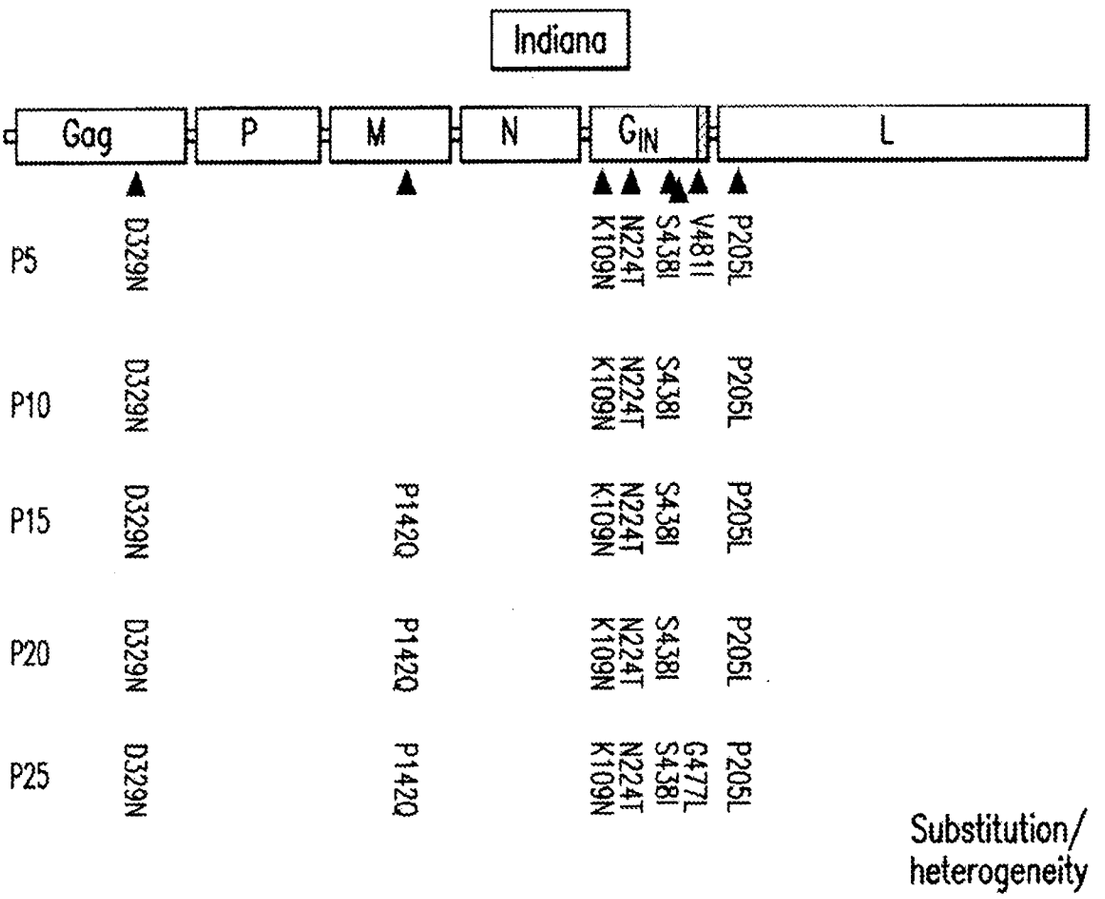

VSVN4CT1-gag1
IN serotype
NJ serotype
Serial passages in Vero cells monolayer in T-25 flasks infected at MOI of 0.01
P1
P2
P3
P4
P5
• Continue to P25
• Test P5, P10, P15, P20 & P25
• Virus quantification
• Gag gene expression
• Full-length genome sequence
• Growth kinetics
• Mouse IC LD_{50}

FIG.2



- All P15 substitutions were carried all the way to P25
- At P25, one additional aa substitution was seen at aa 477 which is located within transmembrane (TM) region of G

FIG.3

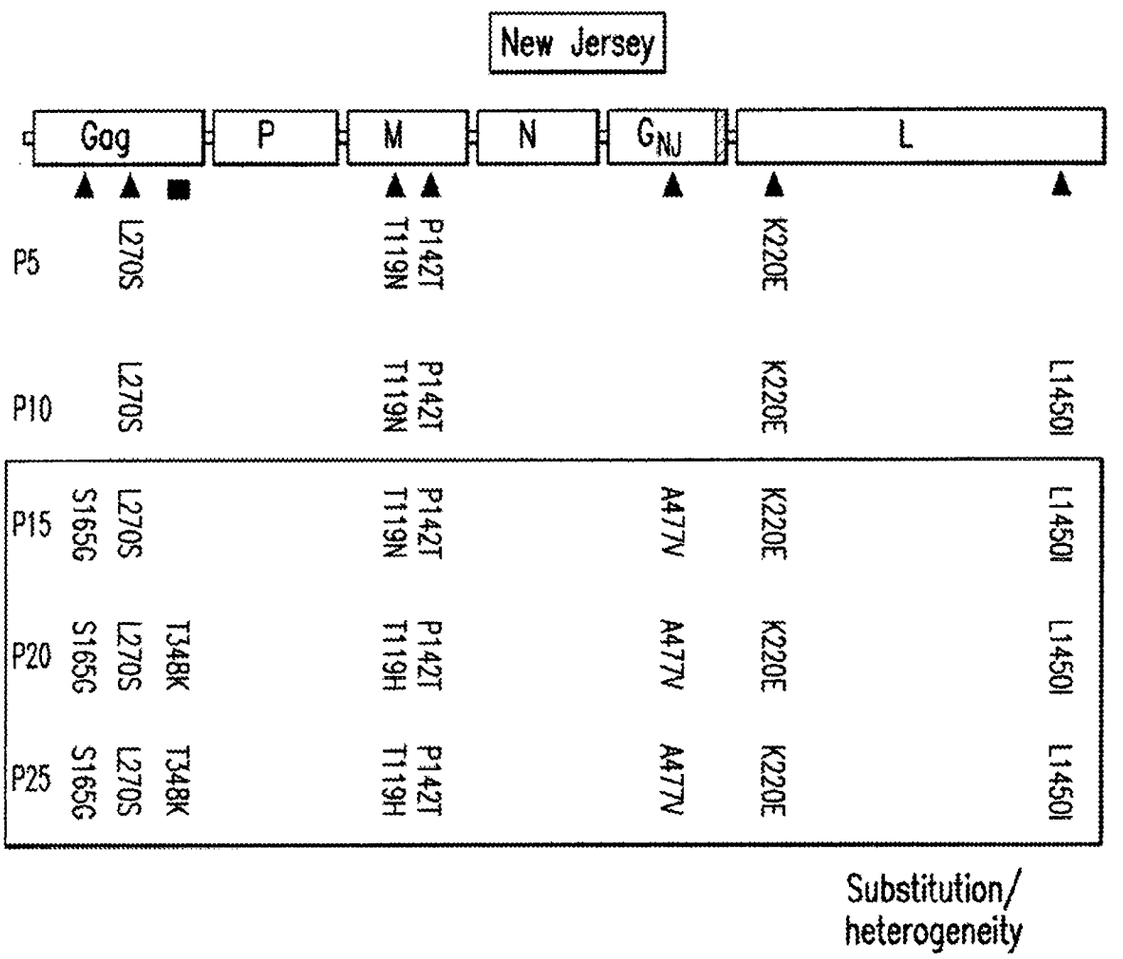
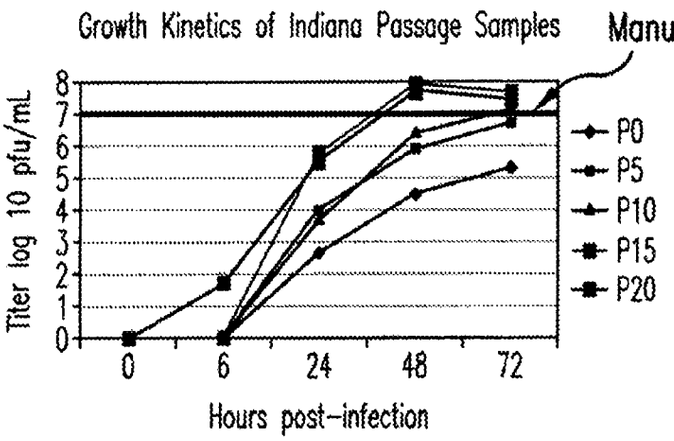
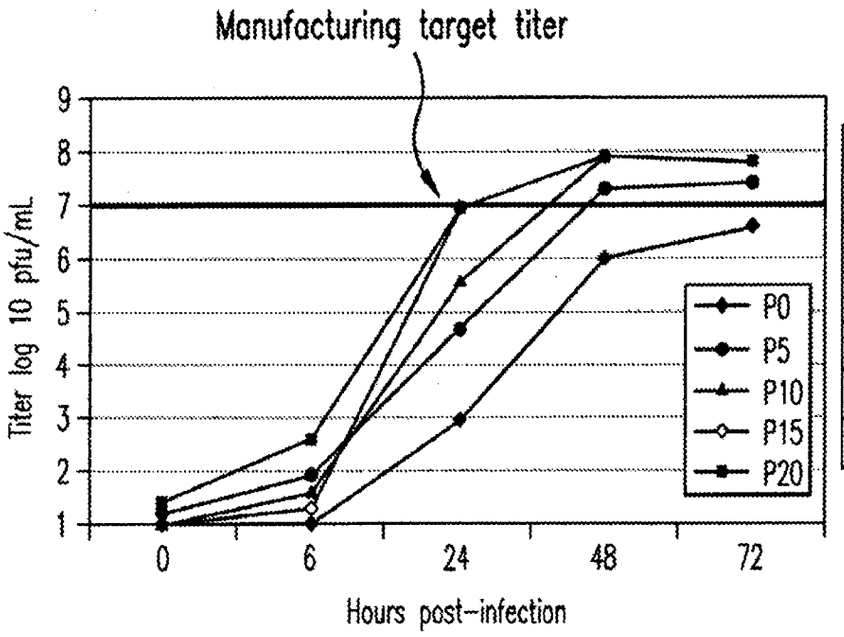

New Jersey
Gag
P
M
N
G_{NJ}
L
P5
L270S
T119N
P142T
K220E
P10
L270S
T119N
P142T
K220E
L1450I
P15
S165G
L270S
T119N
P142T
A477V
K220E
L1450I
P20
S165G
L270S
T348K
T119H
P142T
A477V
K220E
L1450I
P25
S165G
L270S
T348K
T119H
P142T
A477V
K220E
L1450I
Substitution/
heterogeneity

FIG.4



	Peak Virus titer Log 10 pfu/mL
P0	5.3
P5	6.7
P10	7.2
P15	7.7
P20	7.9

FIG.5



	Peak titer Log 10 pfu/mL
P0	6.6
P5	7.4
P10	7.9
P15	8.2
P20	7.9

FIG.6

Protocol:

- Viruses Tested: P0, P15, P20, P25
- Doses/Route: 10^5, 10^6, & 10^7 PFU i.c.
- Animals: Swiss Webster mice (10 mice per test group)
- Study Initiated: Friday, 3/23/07
- Study Finishes: Friday, 4/13/07

Status Report: Day 21:

- Retention titers all within acceptable range
- No measurable mortality or morbidity in any test group at any dose
- No Change in LD_{50} with passaged virus (See Table on right)

LD50 Results

Passage #	LD50 in pfu
P0	$>10^7$
P15	$>10^7$
P20	$>10^7$
P25	$>10^7$

FIG.7

P25-VSV IND

Comparison of nucleotide (NT) and amino acid (AA) sequences of original (P0) and passaged viruses.
The NT and AA substitutions in the passaged viruses are shown in bold

```
1      acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg
                                                                >>.....HIV-1 Gag.....>
                                                                  M  G  A  R  A  S  V  L  S

101    gggagaatta gatcgatggg aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg caagcaggga gctagaacga
       >.....HIV-1 Gag.....>
       G  G  E  L  D  R  W  E  K  I  R  L  R  P  G  G  K  K  K  Y  K  L  K  H  I  V  W  A  S  R  E  L  E  R

201    ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat
       >.....HIV-1 Gag.....>
         F  A  V  N  P  G  L  L  E  T  S  E  G  C  R  Q  I  L  G  Q  L  Q  P  S  L  Q  T  G  S  E  E  L  R

301    cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa
       >.....HIV-1 Gag.....>
        S  L  Y  N  T  V  A  T  L  Y  C  V  H  Q  R  I  E  I  K  D  T  K  E  A  L  D  K  I  E  E  E  Q  N

401    aagtaagaaa aaagcacagc aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga acatccaggg gcaaatggta
       >.....HIV-1 Gag.....>
       K  S  K  K  K  A  Q  Q  A  A  A  D  T  G  H  S  N  Q  V  S  Q  N  Y  P  I  V  Q  N  I  Q  G  Q  M  V

501    catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa aagtagtaga agagaaggct ttcagcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag
       >.....HIV-1 Gag.....>
         H  Q  A  I  S  P  R  T  L  N  A  W  V  K  V  V  E  E  K  A  F  S  P  E  V  I  P  M  F  S  A  L  S
```

FIG.8A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

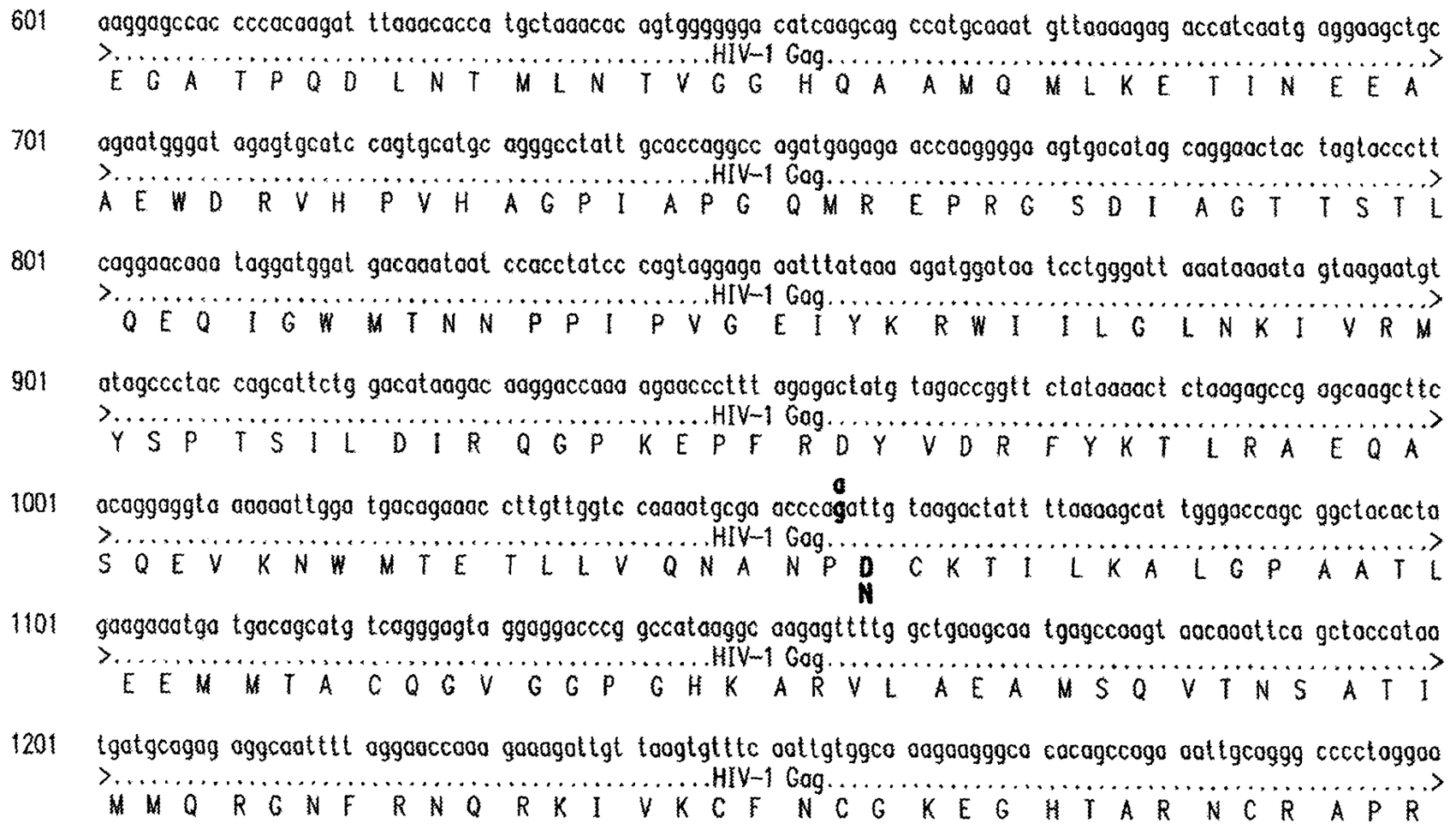


FIG.8B

```
1301  aaaggctgt tggaaatgtg gaaaggaagg acaccaaatg aagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga tctggcttc ctacaaggga
      >.....HIV-1 Gag.....<
      K K G C W K C G K E G H Q M K D C T E R Q A N F L G K I W P S Y K G

1401  aggccagaga atttcttca gagcagacca gaagccaacag cccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactccccct cagaagcagg
      >.....HIV-1 Gag.....<
        R P G N F L Q S R P E P T A P P E E S F R S G V E T T T P P Q K Q

1501  agccgatagg caaggaactg tatccttaa ctccctcag atcactcttt ggcaacgacc ctcgtcaca ataatgacta gcatattatg ctacatatga
      >.....HIV-1 Gag.....>>
        E P I D K E L Y P L T S L R S L F G N D P S S Q ~

1601  aaaaaactaa cagatatcat ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcagt agggagagta gatgagatcg
      >>.....P.....<
                M D N L L T K V R E Y L K S Y S R L D Q A V G E I D E I

1701  aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga
      >.....P.....<
        E A Q R A E K S N Y E L F Q E D G V E E H T K P S Y F Q A A D D S

1801  cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc tgagcaagtt gaagcttta tacagaagcc tttagatgac
      >.....P.....<
      D T E S E P E I E D N Q G L Y A P D P E A E Q V E G F I Q G P L D D

1901  tatgcagatg aggaagtgga tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac cttacggttg acatcgccag
      >.....P.....<
        Y A D E E V D V V F T S D W K Q P E L E S D E H G K T L R L T S P
```

FIG.8C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
2001  agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc
      >.....P.....>
       E  G  L  S  G  E  Q  K  S  Q  W  L  S  T  I  K  A  V  V  Q  S  A  K  Y  W  N  L  A  E  C  T  F  E

2101  atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta
      >.....P.....>
       A  S  G  E  G  V  I  M  K  E  R  Q  I  T  P  D  V  Y  K  V  T  P  V  M  N  T  H  P  S  Q  S  E  A  V

2201  tcagatgttt ggtctctctc aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt ggatgaattg ttctcatcta
      >.....P.....>
        S  D  V  W  S  L  S  K  T  S  M  T  F  Q  P  K  K  A  S  L  Q  P  L  T  I  S  L  D  E  L  F  S  S

2301  gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt
      >.....P.....>
       R  G  E  F  I  S  V  G  G  D  G  R  M  S  H  K  E  A  I  L  L  G  L  R  Y  K  K  L  Y  N  Q  A  R

2401  caaatattct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc aatccattca tcatgagttc cttaaagaag attctcggtc
      >.....P.....>>
       V  K  Y  S  L

                                                                                    >>.....M.....>
                                                                                      M  S  S  L  K  K  I  L  G

2501  tgaaggggaa aggtaagaaa tctaagaaat tagggatcgc accacccct tatgaagagg acactagcat ggagtatgct ccgagcgctc caattgacaa
      >.....M.....>
       L  K  G  K  G  K  K  S  K  K  L  G  I  A  P  P  P  Y  E  E  D  T  S  M  E  Y  A  P  S  A  P  I  D

2601  atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt
      >.....M.....>
       K  S  Y  F  G  V  D  E  M  D  T  Y  D  P  N  Q  L  R  Y  E  K  F  F  F  T  V  K  M  T  V  R  S  N  R
```

FIG.8D

```
2701  ccgttcagga catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc ggaatggcag ggaagcgtcc cttctacaaa atcttggctt
>.....M.....>
      P F R T Y S D V A A A V S H W D H M Y I G M A G K R P F Y K I L A

2801  tttgggttc ttctaatcta aaggccactc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa ggcaggcttatttgccaca
>.....M.....>
      F L G S N L K A T P A V L A D Q G Q P E Y H A H C E G R A Y L P Q

2901  taggatgggg aagacccctc ccatgctcaa tgtaccagag cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc
>.....M.....>
      H R M G K T P P M L N V P E H F R R P F N I G L Y K G T I E L T M T

3001  atctacgatg atggtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc aaattttctg attcagaga gaaggcctta atgttggcc
>.....M.....>
      I Y D D E S L E A A P M I W D H F N S S K F S D F R E K A L M F G

3101  tgattgtcga gaaaaaggca tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc ttctgaacaa tccccgattt
>.....M.....>>
      L I V E K K A S G A W V L D S I G H F K -

3201  actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca
                                                                    >>.....N.....<
                                                                    M S V T V

3301  aggggatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg aatacccggc agattactic agaaaatcaa aggagattcc
>.....N.....<
      K R I I D N T V V V P K L P A N E D P V E Y P A D Y F R K S K E I
```

FIG.8E

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
3401  tctttacatc aatactacaa aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa tcatacatgt caacagctac
      >.....................................................N.....................................................>
      P  L  Y  I  N  T  T  K  S  L  S  D  L  R  G  Y  V  Y  Q  G  L  K  S  G  N  V  S  I  I  H  V  N  S  Y

3501  ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg
      >.....................................................N.....................................................>
        L  Y  G  A  L  K  D  I  R  G  K  L  D  K  D  W  S  S  F  G  I  N  I  G  K  A  G  D  T  I  G  I  F

3601  accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact
      >.....................................................N.....................................................>
       D  L  V  S  L  K  A  L  D  G  V  L  P  D  G  V  S  D  A  S  R  T  S  A  D  D  K  W  L  P  L  Y  L

3701  tggcttatac agagtgggca gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa tgatcaatga acagtttgaa
      >.....................................................N.....................................................>
      L  G  L  Y  R  V  G  R  T  Q  M  P  E  Y  R  K  K  L  M  D  G  L  T  N  Q  C  K  M  I  N  E  Q  F  E

3801  cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca
      >.....................................................N.....................................................>
        P  L  V  P  E  G  R  D  I  F  D  V  W  G  N  D  S  N  Y  T  K  I  V  A  A  V  D  M  F  F  H  M  F

3901  aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg
      >.....................................................N.....................................................>
       K  K  H  E  C  A  S  F  R  Y  G  T  I  V  S  R  F  K  D  C  A  A  L  A  T  F  G  H  L  C  K  I  T

4001  aatgtctaca gaagatgtaa cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc aagaaattga caaggccgat
      >.....................................................N.....................................................>
      G  M  S  T  E  D  V  T  T  W  I  L  N  R  E  V  A  D  E  M  V  Q  M  M  L  P  G  Q  E  I  D  K  A  D
```

FIG.8F

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
4101  tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc
      >.....................................................N.....................................................>
        S  Y  M  P  Y  L  I  D  F  G  L  S  S  K  S  P  Y  S  S  V  K  N  P  A  F  H  F  W  G  Q  L  T  A

4201  ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg
      >.....................................................N.....................................................>
        L  L  L  R  S  T  R  A  R  N  A  R  Q  P  D  D  I  E  Y  T  S  L  T  T  A  G  L  L  Y  A  Y  A  V

4301  atcctctgcc gacttggcac aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga ctaatgcacc gccacaaggc
      >.....................................................N.....................................................>
      G  S  S  A  D  L  A  Q  Q  F  C  V  G  D  N  K  Y  T  P  D  D  S  T  G  G  L  T  T  N  A  P  P  Q  G

4401  agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag
      >.....................................................N.....................................................>
        R  D  V  V  E  W  L  G  W  F  E  D  Q  N  R  K  P  T  P  D  M  M  Q  Y  A  K  R  A  V  M  S  L  Q

4501  gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata attctcagat cacctattat atattatgct acatatgaaa
      >.............................N.............................>>
      G  L  R  E  K  T  I  G  K  Y  A  K  S  E  F  D  K  -

4601  aaaactaaca gagatcgatc tgtttacgcg tcactatgaa gtgccttttg tacttagcct ttttattcat tggggtgaat tgcaagttca ccatagtttt
                                        >>.....................................G.....................................>
                                          M  K  C  L  L  Y  L  A  F  L  F  I  G  V  N  C  K  F  T  I  V

4701  tccacacaac caaaaaggaa actggaaaaa tgttccttct aattaccatt attgcccgtc aagctcagat ttaaattggc ataatgactt aataggcaca
      >.....................................................G.....................................................>
      F  P  H  N  Q  K  G  N  W  K  N  V  P  S  N  Y  H  Y  C  P  S  S  S  D  L  N  W  H  N  D  L  I  G  T
```

FIG.8G

```
4801  gccttacaag tcaaaatgcc caagagtcac aaggctattc gagcagacgg ttggatgtgt catgcttcca aatgggtcac tacttgtgat ttccgttggt
      >.....................................................G.....................................................>
        A  L  Q  V  K  M  P  K  S  H  K  A  I  R  A  D  G  W  M  C  H  A  S  K  W  V  T  T  C  D  F  R  W

                                                                    t
4901  atggaccgaa gtatataaca cattccatcc gatccttcac tccatctgta gaacaatgca aggaaagcat tgaacaaacg aaacaaggaa cttggctgaa
      >.....................................................G.....................................................>
        Y  G  P  K  Y  I  T  H  S  I  R  S  F  T  P  S  V  E  Q  C  K  E  S  I  E  Q  T  K  Q  G  T  W  L
                                                                    N

5001  tccaggcttc cctcctcaaa gttgtggata tgcaactgtg acggatgccg aagcagtgat tgtccaggtg actcctcacc atgtgctggt tgatgaatac
      >.....................................................G.....................................................>
      N  P  G  F  P  P  Q  S  C  G  Y  A  T  V  T  D  A  E  A  V  I  V  Q  V  T  P  H  H  V  L  V  D  E  Y

5101  acaggagaat gggttgattc acagttcatc aacggaaaat gcagcaatta catatgcccc actgtccata actctacaac ctggcattct gactataagg
      >.....................................................G.....................................................>
        T  G  E  W  V  D  S  Q  F  I  N  G  K  C  S  N  Y  I  C  P  T  V  H  N  S  T  T  W  H  S  D  Y  K

5201  tcaaagggct atgtgattct aacctcattt ccatggacat cacctictic tcagaggacg gagagctatc atccctggga aaggagggca cagggttcag
      >.....................................................G.....................................................>
        V  K  G  L  C  D  S  N  L  I  S  M  D  I  T  F  F  S  E  D  G  E  L  S  S  L  G  K  E  G  T  G  F
           c
5301  aagtaactac tttgcttatg aaactggagg caaggcctgc aaaatgcaat actgcaagca ttggggagtc agactcccat caggtgtctg gttcgagatg
      >.....................................................G.....................................................>
      R  S  N  Y  F  A  Y  E  T  G  G  K  A  C  K  M  Q  Y  C  K  H  W  G  V  R  L  P  S  G  V  W  F  E  M
            T
```

FIG.8H

104

```
5401  gctgataagg atctctttgc tgcagccaga ttccctgaat gcccagaagg gtcaagtatc tctgctccat ctcagaccta agtgatgtta agtctaattc
>.....G.....>
        A  D  K  D  L  F  A  A  A  R  F  F  P  E  C  P  E  G  S  S  I  S  A  P  S  Q  T  S  V  D  V  S  L  I

5501  aggacattga gaggatcttg gattatttcc tctgccaaga aacctgggag aaaatcagag cgggtcttcc aatctctcca gtgatctcta gctatcttgc
>.....G.....>
        Q  D  V  E  R  I  L  D  Y  S  L  C  Q  E  T  W  S  K  I  R  A  G  L  P  I  S  P  V  D  L  S  Y  L

5601  tcctaaaaac ccaggaaccg gtcctgcttt caccataatc aatggtaccc taaaatactt tgagaccaga tacatcagag tgatattgc tgctccaatc
>.....G.....>
        A  P  K  N  P  G  T  G  P  A  F  T  I  I  N  G  T  L  K  Y  F  E  T  R  Y  I  R  V  D  I  A  A  P  I

5701  ctctcaagaa tggtcggaat gatcagtgga actaccacag aaaggaaact gtggatgac tgggcaccat atgaagacgt ggaaattgga cccaatgggg
>.....G.....>
        L  S  R  M  V  G  M  I  S  G  T  T  T  E  R  E  L  W  D  D  W  A  P  Y  E  D  V  E  I  G  P  N  G

5801  ttctgaggac cagttcagga tataagttte ctttatacat gattggacat ggtatgttgg actcgatct tcatcttagc tcaaggctc aggtgttcga
>.....G.....>
        V  L  R  T  S  S  G  Y  K  F  P  L  Y  M  I  G  H  G  M  L  D  S  D  L  H  L  S  S  K  A  Q  V  F

                                                t
5901  acatcctcac attcaagacg ctgcttcgca actcctgat gatgaggtt tatttttgg tgatactggg ctatccaaaa atccaatcga gcttgtagga
>.....G.....>
        E  H  P  H  I  Q  D  A  A  S  Q  L  P  D  D  E  S  L  F  F  G  D  T  G  L  S  K  N  P  I  E  L  V  E
                                                I
```

FIG.8I

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

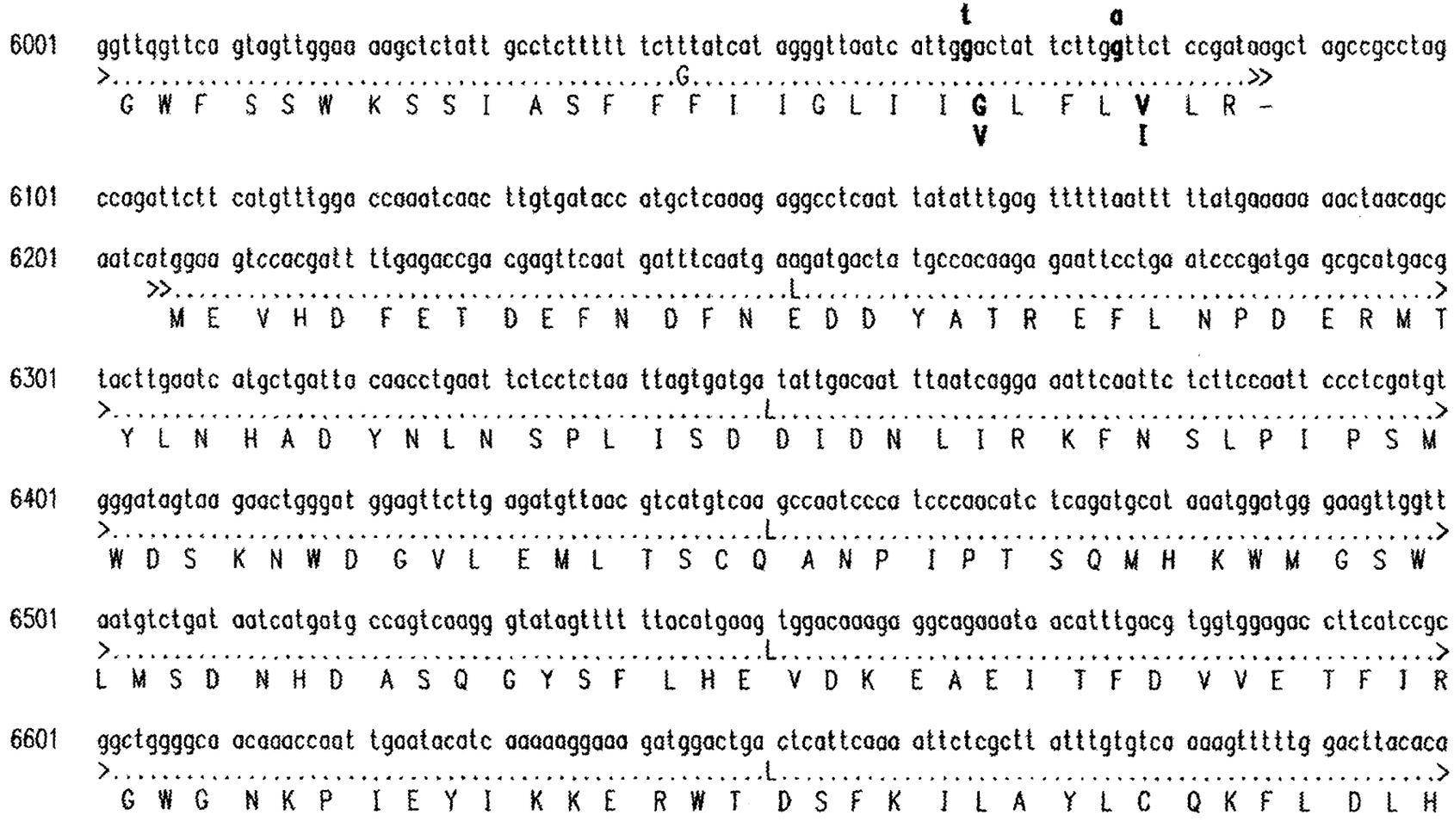


FIG.8J

6701
agttgacatt aatcctaaat gctgtctctg aggtggaatt gctcaactta gcgaggactt tcaaaggcaa agtcagaaga agttctcatg gaacgaacat
K L T L I L N A V S E V E L L N L A R T F K G K V R R S S H G T N
6801
atgcaggatt agggttccca gcttggtcc tacttttatt tcagaaggat gggcttactt caagaaactt gatattctaa tggaccgaaa cttlctgtta
I C R I R V P S L G P T F I S E G W A Y F K K L D I L M D R N F L L
6901
atggtcaaag atgtgattat agggaggatg caaacggtgc tatccatggt atgtagaata gacaacctgt tctcagagca agacatcttc tccttctaa
M V K D V I I G R M Q T V L S M V C R I D N L F S E Q D I F S L L
7001
atatctacag aattggagat aaaattgtgg agaggcaggg aatttttct tatgacttga ttaaaatggt ggaaccgata tgcaacttga agctaatgaa
N I Y R I G D K I V E R Q G N F S Y D L I K M V E P I C N L K L M
7101
attagcaaga gaatcaaggc ctttagtccc acaattccct catttgaaa atcatatcaa gacttctgtt gatgaaggag caaaaattga ccgaggtata
K L A R E S R P L V P Q F P H F E N H I K T S V D E G A K I D R G I
7201
agatttcctcc atgatcagat aatgagtgtg aaaacagtgg atctcacact ggtgatttat ggatcgttca gacattggag tcatccttlt atagattatt
R F L H D Q I M S V K T V D L T L V I Y G S F R H W G H P F I D Y
7301
acactggact agaaaaatta catcccaag taaccatgaa gaaagatatt gatgtgtcat atgcaaagc actlgcaagt gatttagctc ggattgttct
Y T G L E K L H S Q V T M K K D I D V S Y A K A L A S D L A R I V

FIG.8K

```
7401  atttcaacag ttcaatgatc ataaaaagtg gttcgtgaat ggagacttgc tcgctcatga tcatcgcttt aaaagtcatg ttaaagaaaa tacatggccc
      >.....L.....>
      L F Q Q F N D H K K W F V N G D L L P H D H P F K S H V K E N T W P

7501  acagctgctc aagttcaaga ttttggagat aaatggcatg aacttccgct gattaaatgt tttgaaatac ccgacttact agacccatcg ataatatact
      >.....L.....>
        T A A Q V Q D F G D K W H E L P L I K C F E I P D L L D P S I I Y

7601  ctgacaaaag tcattcaatg aataggtcag aggtgttgaa acatgtccga atgaatccga acactcctat ccctagtaaa aaggtgttgc agactatgtt
      >.....L.....>
       S D K S H S M N R S E V L K H V R M N P N T P I P S K K V L Q T M

7701  ggacacaaag gctaccaatt ggaaagaatt tcttaaagag attgatgaga agggcttaga tgatgatgat ctaattattg gtcttaaagg aaaggagagg
      >.....L.....>
      L D T K A T N W K E F L K E I D E K G L D D D D L I I G L K G K E R

7801  gaactgaagt tggcaggtag attttttctcc ctaatgtctt ggaaattgcg agaatacttt gtaattaccg aatatttgat aaagactcat ttcgtcccta
      >.....L.....>
        E L K L A G R F F S L M S W K L R E Y F V I T E Y L I K T H F V P

7901  tgtttaaagg cctgacaatg gcggacgatc taactgcagt cattaaaaag atgttagatt cctcatccgg ccaaggattg aagtcatatg aggcaatttg
      >.....L.....>
       M F K G L T M A D D L T A V I K K M L D S S S G Q G L K S Y E A I

8001  catagccaat cacattgatt acgaaaaatg gaataaccac caaaggaagt tatcaaacgg cccagtgttc cgagttatgg gccagttctt aggttatcca
      >.....L.....>
      C I A N H I D Y E K W N N H Q R K L S N G P V F R V M G Q F L G Y P
```

FIG.8L

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
8101  tccttaatcg agagaactca tgaatttttt gagaaaagtc ttatatacta caatggaaga ccagacttga tgcgtgttca caacaacaca ctgatcaatt
      >.....L.....>
        S  L  I  E  R  T  H  E  F  F  E  K  S  L  I  Y  Y  N  G  R  P  D  L  M  R  V  H  N  N  T  L  I  N

8201  caacctccca acgagtttgt tggcaaggac aagagggtgg actggaaggt ctacggcaaa aaggatggag tatcctcaat ctactggtta ttcaaagaga
      >.....L.....>
        S  T  S  Q  R  V  C  W  Q  G  Q  E  G  G  L  E  G  L  R  Q  K  G  W  S  I  L  N  L  L  V  I  Q  R

8301  ggctaaaatc agaaacactg ctgtcaaagt cttggcacaa ggtgataatc aagttatttg cacacagtat aaaacgaaga aatcgagaaa cgttgtagaa
      >.....L.....>
      E  A  K  I  R  N  T  A  V  K  V  L  A  Q  G  D  N  Q  V  I  C  T  Q  Y  K  T  K  K  S  R  N  V  V  E

8401  ttacagggtg ctctcaatca aatggtttct aataatgaga aaattatgac tgcaatcaaa atagggacag ggaagttagg actttgata aatgacgatg
      >.....L.....>
        L  Q  G  A  L  N  Q  M  V  S  N  N  E  K  I  M  T  A  I  K  I  G  T  G  K  L  G  L  L  I  N  D  D

8501  agactatgca atctgcagat tacttgaatt atggaaaaat accgattttc cgtggagtga ttagagggtt agagaccaag agatggtcac gagtgacttg
      >.....L.....>
        E  T  M  Q  S  A  D  Y  L  N  Y  G  K  I  P  I  F  R  G  V  I  R  G  L  E  T  K  R  W  S  R  V  T

8601  tgtcaccaat gaccaaatac ccacttgtgc taatataatg agctcagttt ccacaaatgc tctcaccgta gctcattttg ctgagaaccc aatcaatgcc
      >.....L.....>
      C  V  T  N  D  Q  I  P  T  C  A  N  I  M  S  S  V  S  T  N  A  L  T  V  A  H  F  A  E  N  P  I  N  A

8701  atgatacagt acaattattt tgggacattt gctagactct tgttgatgat gcatgatcct gctcttcgtc aatcattgta tgaagttcaa gataagatac
      >.....L.....>
        M  I  Q  Y  N  Y  F  G  T  F  A  R  L  L  L  M  M  H  D  P  A  L  R  Q  S  L  Y  E  V  Q  D  K  I
```

FIG.8M

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
8801  cgggcttgca cagttctact ttcaaatacg ccatgttgta tttggaccct tccattggag gagtgtcggg catgtctttg tccaggtttt tgattagagc
      >.....L.....>
       P  G  L  H  S  S  T  F  K  Y  A  M  L  Y  L  D  P  S  I  G  G  V  S  G  M  S  L  S  R  F  L  I  R

8901  cttcccagat cccgtaacag aaagtctctc attctggaga ttcatccatg tacatgctcg aagtgagcat ctgaaggaga tgagtgcagt atttggaaac
      >.....L.....>
      A  F  P  D  P  V  T  E  S  L  S  F  W  R  F  I  H  V  H  A  R  S  E  H  L  K  E  M  S  A  V  F  G  N

9001  cccgagatdg ccaagttttcg aataactcac atagacaagc tagtagaaga tccaacctct ctgaacatcg ctatgggaat gagtccagcg aacttgttaa
      >.....L.....>
        P  E  I  A  K  F  R  I  T  H  I  D  K  L  V  E  D  P  T  S  L  N  I  A  M  G  M  S  P  A  N  L  L

9101  agactgaggt taaaaaatgc ttaatcgaat caagacaaac catcaggaac caggtgatta aggatgcaac catatatttg tatcatgaag aggatcggct
      >.....L.....>
       K  T  E  V  K  K  C  L  I  E  S  R  Q  T  I  R  N  Q  V  I  K  D  A  T  I  Y  L  Y  H  E  E  D  R

9201  cagaagtttc ttatggtcaa taaatcctct gttccctaga tttttaagtg aattcaaatc aggcactttt ttgggagtcg cagacgggct catcagtcta
      >.....L.....>
      L  R  S  F  L  W  S  I  N  P  L  F  P  R  F  L  S  E  F  K  S  G  T  F  L  G  V  A  D  G  L  I  S  L

9301  tttcaaaatt ctcgtactat tcggaactcc tttaagaaaa agtatcatag ggaattggat gatttgattg tgaggagtga ggtatcctct ttgacacatt
      >.....L.....>
        F  Q  N  S  R  T  I  R  N  S  F  K  K  K  Y  H  R  E  L  D  D  L  I  V  R  S  E  V  S  S  L  T  H

9401  tagggaaact tcatttgaga aggggatcat gtaaaatgtg gacatgttca gctactcatg ctgacacatt aagatacaaa tcctggggcc gtacagttat
      >.....L.....>
       L  G  K  L  H  L  R  R  G  S  C  K  M  W  T  C  S  A  T  H  A  D  T  L  R  Y  K  S  W  G  R  T  V
```

FIG.8N

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
9501   tgggacaact gtaccccatc cattagaaat gttgggtcca caacatcgaa aagagactcc ttgtgcacca tgtaacacat cagggttcaa ttatgtttct
       >.....................................................L.....................................................>
       I  G  T  T  V  P  H  P  L  E  M  L  G  P  Q  H  R  K  E  T  P  C  A  P  C  N  T  S  G  F  N  Y  V  S

9601   gtgcattgtc cagacgggat ccatgacgtc tttagttcac ggggaccatt gcctgcttat ctagggtcta aaacatctga atctacatct attttgcagc
       >.....................................................L.....................................................>
         V  H  C  P  D  G  I  H  D  V  F  S  S  R  G  P  L  P  A  Y  L  G  S  K  T  S  E  S  T  S  I  L  Q

9701   cttgggaaag ggaaagcaaa gtcccactga ttaaaagagc tacacgtctt agagatgcta tctcttggtt tgttgaaccc gactctaaac tagcaatgac
       >.....................................................L.....................................................>
        P  W  E  R  E  S  K  V  P  L  I  K  R  A  T  R  L  R  D  A  I  S  W  F  V  E  P  D  S  K  L  A  M

9801   tatactttct aacatccact ctttaacagg cgaagaatgg accaaaaggc agcatgggtt caaaagaaca gggtctgccc ttcataggtt ttcgacatct
       >.....................................................L.....................................................>
       T  I  L  S  N  I  H  S  L  T  G  E  E  W  T  K  R  Q  H  G  F  K  R  T  G  S  A  L  H  R  F  S  T  S

9901   cggatgagcc atggtgggtt cgcatctcag agcactgcag cattgaccag gttgatggca actacagaca ccatgaggga tctgggagat cagaatttcg
       >.....................................................L.....................................................>
         R  M  S  H  G  G  F  A  S  Q  S  T  A  A  L  T  R  L  M  A  T  T  D  T  M  R  D  L  G  D  Q  N  F

10001  acttttatt ccaagcaacg ttgctctatg ctcaaattac caccactgtt gcaagagacg gatggatcac cagttgtaca gatcattatc atattgcctg
       >.....................................................L.....................................................>
        D  F  L  F  Q  A  T  L  L  Y  A  Q  I  T  T  T  V  A  R  D  G  W  I  T  S  C  T  D  H  Y  H  I  A

10101  taagtcctgt ttgagaccca tagaagagat caccctggac tcaagtatgg actacacgcc cccagatgta tcccatgtgc tgaagacatg gaggaatggg
       >.....................................................L.....................................................>
       C  K  S  C  L  R  P  I  E  E  I  T  L  D  S  S  M  D  Y  T  P  P  D  V  S  H  V  L  K  T  W  R  N  G
```

FIG.8O

```
10201  gaaggttcgt ggggacaaga gataaaacag atctatcctt tagaaggaaa ttggaagaat ttagcacctg ctgagcaatc ctatcaagtc ggcagatgta
>.....L.....>
       E G S W G Q E I K Q I Y P L E G N W K N L A P A E Q S Y Q V G R C

10301  taggtttttct atatggagac ttggcgtata gaaaatctac tcatgccgag gacagttctc tatttcctct atctatacaa ggtcgtatta gaggtcgagg
>.....L.....>
       I G F L Y G D L A Y R K S T H A E D S S L F P L S I Q G R I R G R

10401  tttcttaaaa gggttgctag acggattaat gagagcaagt tgctgccaag taatacaccg gagaggtctg gctcatttga agaggccggc caacgcagtg
>.....L.....>
       G F L K G L L D G L M R A S C C Q V I H R R S L A H L K R P A N A V

10501  tacgggaggtt tgatttactt gattgataaa ttgagtgtat cacctccatt ccttttcttt actagatcag gacctattag agacgaattg gaaacgattc
>.....L.....>
       Y G G L I Y L I D K L S V S P P F L S L T R S G P I R D E L E T I

10601  cccacaaggt cccaacctcc tatccgacaa gcaaccgtga tatgggggtg attgtcagaa attacttcaa ataccaatgc cgtctaattg aaagggaaaa
>.....L.....>
       P H K I P T S Y P T S N R D M G V I V R N Y F K Y Q C R L I E K G

10701  atacagatca cattatttcac aattatggtt attctcagat gtcttatcca tagacttcat tggaccattc tctatttcca ccaccctctt gcaaatccta
>.....L.....>
       K Y R S H Y S Q L W L F S D V L S I D F I G P F S I S T T L L Q I L

10801  tacaagccat ttttatctgg gaaagataag aatgagttga gagagctggc aaatctttct tcattgctaa gatcagggga gggtgaggaa gacatacatg
>.....L.....>
       Y K P F L S G K D K N E L R E L A N L S S L L R S G E G W E D I H
```

FIG.8P

```
10901  tgaaattctt caccaaggac atattattgt gtccaggagg aatcagacat gcttgcaagt tcgggattgc taaggataat aataaagaca tgagctatcc
>.....L.....<
       V K F F T K D I L L C P E E I R H A C K F G I A K D N N K D M S Y

11001  ccctgggga agggaatcca gagggacaat tacaacaatc cctgttatt atacgaccac ccctaccca aagatgctag agatgcctcc aagaatccaa
>.....L.....<
       P P W G R E S R G T I T T I P V Y Y T T T P Y P K M L E M P R I Q

11101  aatcccctgc tgtccggaat caggtgagc caattaccaa ctggcgctca ttataaaatt cggagtatat tacatggaat gggaatccat tacagggact
>.....L.....<
         N P L L S G I R L G Q L P T G A H Y K I R S I L H G M G I H Y R D

11201  tcttgagttg tgggagcggc tccgagggga tgactgctgc attactacga gaaaatgtgc atagcagggg aatattcaat agtcgttag aattatcagg
>.....L.....<
       F L S C G D G S G G M T A A L L R E N V H S R G I F N S L L E L S

11301  gtcagtcatg cgaggcgcct ctcctgagcc ccccagtgcc ctaggaactt taggagggag taaatcgaga tgtgtaaatg gtgaaacatg ttgggaatat
>.....L.....<
       G S V M R G A S P E P P S A L E T L G G D K S R C V N G E T C W E Y

11401  ccatctgact tatgtgaccc aaggacttgg gactatttcc tccgactcaa agcaggcttg gggcttcaaa ttgatttaat tgtaatggat atgaaggttc
>.....L.....<
         P S D L C D P R T W D Y F L R L K A G L G L Q I D L I V M D M E V

11501  gggattcttc tactagccta gaaattgagg cgaatgttag aaattatgtg caccggattt tggatgagca aggagtttta atctacaaga cttatgaaac
>.....L.....<
       R D S S T S L K I E T N V R N Y V H R I L D E Q G V L I Y K T Y G
```

FIG.8Q

```
11601  atatatttgt gagagcgaaa agaatgcagt aacaatcctt ggtcccatgt tcaagacggt cgacttagtt caacagaat ttagtagttc tcaaacgtct
       >.....L.....<
         T Y I C E S E K N A V T I L G P M F K T V D L V Q T E F S S S Q T S

11701  gaagtatata tggtatgtaa agtttgaag aaattaatcg atgaacccaa tcccgattgg tcttccatca atgaatcctg gaaaaacctg tacgcattcc
       >.....L.....<
           E V Y N V C K G L K K L I D E P N P D W S S I N E S W K N L Y A F

11801  agtcatcaga acaggaattt gccagagcaa agaaggttag tacatacttt acctgacag gtattcccic ccaattcatt cctgatcctt ttgtaaacat
       >.....L.....<
             Q S S E Q E F A R A K K V S T Y F T L T G I P S Q F I P D P F V N

11901  tgagactatg ctacaaatat tcggaglacc cacgggtglg tctcatgcag ctgcttaaa atcatctgat agacctgcag attattgac cattagcctt
       >.....L.....<
               I E T M L Q I F G V P T G V S H A A A L K S S D R P A D L L T I S L

12001  ttttatatgg cgattatatc gtattataac atcaatcata tcaggatagg acgatacct ccgaacccc catcagatgg aattgcacaa aatgtgggga
       >.....L.....<
                 F Y M A I I S Y Y N I N H I R V G P I P P N P P S D G I A Q N V G

12101  tcgctataac tggtataagc tttgactga gtttgatgga gaaagacatt ccactatatc aacagtattt agcagtiatc cagcaatcat tcccgattag
       >.....L.....<
                   I A I T G I S F W L S L M E K D I P L Y Q Q C L A V I Q Q S F P I

12201  gtggaggct gttcagtaa aggaggata caagcagaag tggagtatta gaggtgatgg gctcccaaaa gatacccgaa tttcagactc cttggcccca
       >.....L.....<
                     R W E A V S V K G G Y K Q K W S T R G D G L P K D T R I S D S L A P
```

FIG.8R

```
12301  atcgggaact ggatcagatc tctggaattg gtccgaaacc aagttcgtct aaatccattc aatgagatct tgttcaatca gctatgtcgt acagtggata
       >.....L.....>
         I G N W I R S L E L V R N Q V R L N P F N E I L F N Q L C R T V D

12401  atcattigaa atggtcaaat ttgcgaagaa acacaggaat gattgaatgg atcaatagac gaatttcaaa agaagaccgg tctatactga tgttgaagag
       >.....L.....>
         N H L K W S N L R R N T G M I E W I N R R I S K E D R S I L M L K

12501  tgacctacac gaggaaaact ctiggagaga ttaaaaaatc atgaggagac tccaaacttt aagtatgaaa aaaacttiga tccttaagac cctcttgtgg
       >.....L.....>>
         S D L H E E N S W R D -

12601  ttttiattit ttatctggtt ttgtgtctt cgttaaaaaa tcatgaggag actccaaact ttaagtatga aaaaacttt gatccttaag accctcttgt

12701  ggttttatt ttttatctgg ttttgtgtc ttcgt
```

FIG.8S

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

P25-VSV NJ

Comparison of nucleotide (NT) and amino acid (AA) sequences of original (P0) and passaged viruses.
The NT and AA substitutions in the passaged viruses are shown in bold

```
1    acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg
                                                                    >>.....HIV-1 Gag.....>
                                                                      M  G  A  R  A  S  V  L  S

101  gggagaatta gatcgatggg aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg caagcaggga gctagaacga
     >.....HIV-1 Gag.....>
     G  G  E  L  D  R  W  E  K  I  R  L  R  P  G  G  K  K  K  Y  K  L  K  H  I  V  W  A  S  R  E  L  E  R

201  ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat
     >.....HIV-1 Gag.....>
       F  A  V  N  P  G  L  L  E  T  S  E  G  C  R  Q  I  L  G  Q  L  Q  P  S  L  Q  T  G  S  E  E  L  R

301  cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa
     >.....HIV-1 Gag.....>
      S  L  Y  N  T  V  A  T  L  Y  C  V  H  Q  R  I  E  I  K  D  T  K  E  A  L  D  K  I  E  E  E  Q  N

401  aagtaagaaa aaagcacagc aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga acatccaggg gcaaatggta
     >.....HIV-1 Gag.....>
     K  S  K  K  K  A  Q  Q  A  A  A  D  T  G  H  S  N  Q  V  S  Q  N  Y  P  I  V  Q  N  I  Q  G  Q  M  V

                                                                    g
501  catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa aagtagtaga agagaaggct ttcagcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag
     >.....HIV-1 Gag.....>
       H  Q  A  I  S  P  R  T  L  N  A  W  V  K  V  V  E  E  K  A  F  S  P  E  V  I  P  M  F  S  A  L  S
                                                                    G
```

FIG.9A

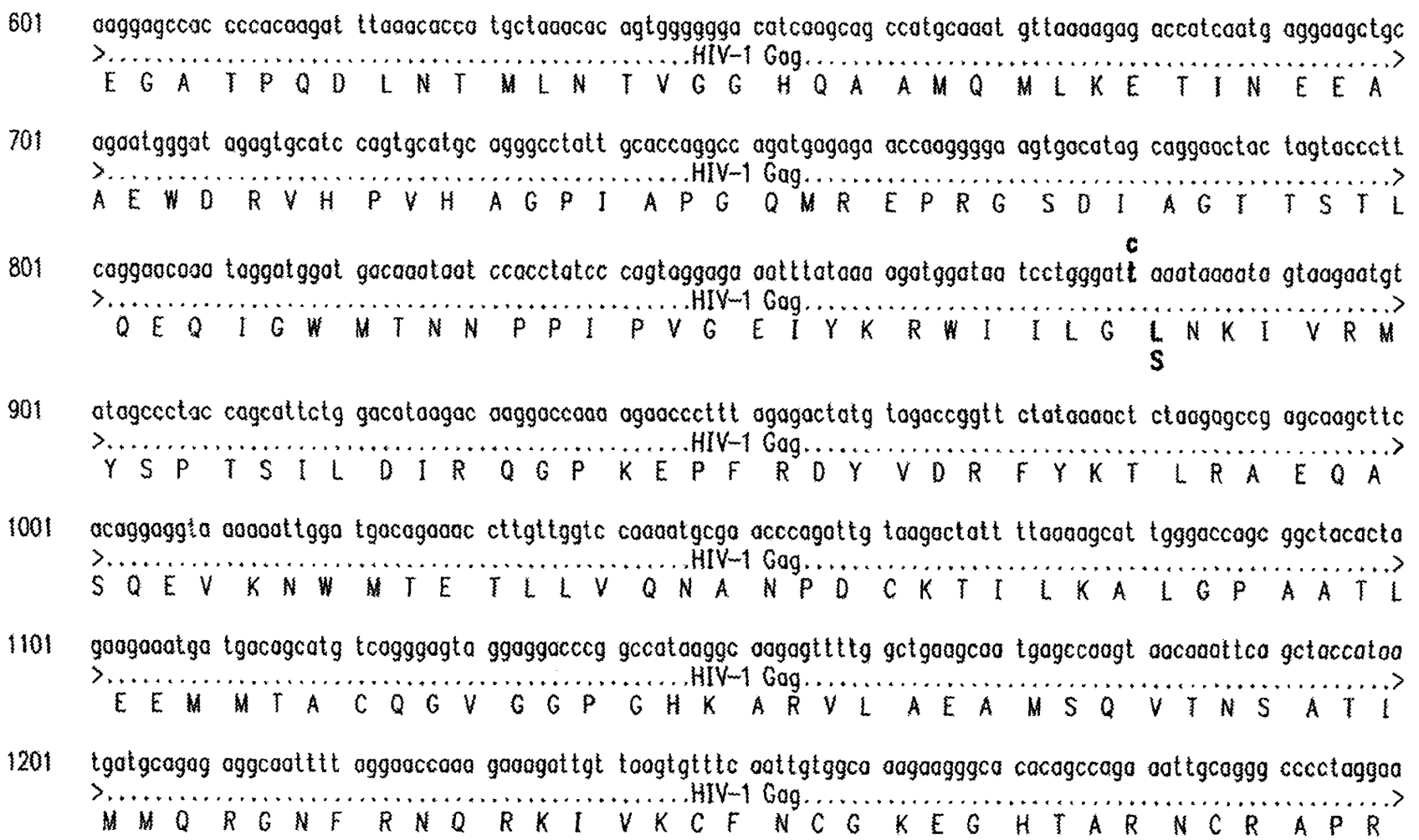


FIG.9B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

1301
aaaggctgt tggaatgtg gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga tctggccttc ctacaagggaa
HIV-1 Gag
K K G C W K C G K E G H Q M K D C T E R Q A N F L G K I W P S Y K G
1401
agccagagga atttcttca gagcagacca gagccaacag ccccaccaga agagcttc agtctgaggg taggacaac aactccccct cagaagcagg
HIV-1 Gag
R P C N F L Q S R P E P T A P P E E S F R S G V E T T P P Q K Q
1501
agccgaggcg caggaactg tatctttaa ctcctcag atcactctt ggcaacgacc cctcgtcaca ataatgacta gcatattatg ctacatatga
HIV-1 Gag
E P I D K E L Y P L T S L R S L F G N D P S S Q -
1601
aaaaactaa cagatatcat ggataatctc acaaaggttc gtaggtatct tctcgtctgg atcaggcgat aggaggata gatgaatcg
P
M D N L I K V R E Y L K S Y S R L D Q A V G E I D E I
1701
aagcacaacg agctgaaag tccaattatg agtgttcca agaggatgga gtggaagac atactagcc ctcttatttt caggcacag atgattctga
P
E A Q R A E K S N Y E L F Q E D G V E E H T K P S Y F Q A A D D S
1801
cacagatct gaaccagaa ttgaagaca tcaagcttg tatgcaccag atccagagc tgagcagtt gaggcttta tacaggagcc tttgatgac
P
D T E S E P E I E D N Q G L Y A P D P E A E Q V E G F I Q G P L D D
1901
tatgcgatg aggagtgga tgttgtattt actcagact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgcagcac atgaggagac ctacggttg acatcacag
P
Y A D E E V D V V F I S D W K Q P E L E S D E H G K T L R L T S P

FIG.9C

```
2001  agggttaag tgggagcag aaatcccagt ggctttcgac gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcaggtgca cattgaagc
                                                P
      >.....<
        E G L S G E Q K S Q W L S T I K A V V Q S A K Y W N L A E C T F E

2101  atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataggtcac tccagtgatg aacacaatc cgtcccaatc agaagcagta
                                                P
      >.....<
        A S G E G V I M K E R Q I T P D V Y K V T P V M N T H P S Q S E A V

2201  tcagatgttt ggtctctctc aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt ggatgaatig ttctcatcta
                                                P
      >.....<
        S D V W S L S K T S M T F Q P K K A S L Q P L T I S L D E L F S S

2301  gaggaagatt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt
                                                P
      >.....<
        R G E F I S V G G D G R M S H K E A I L L G L R Y K K L Y N Q A R

2401  caaatattct ctgtggacta tgaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc aatccattca tcatgagttc cttaaagag attctcggtc
      >.....P.....>>
        V K Y S L –

                                                >>.....M.....>
                                                  M S S L K K I L G

2501  tgaaggggaa aggtaaggaa tctaagaat tagggatcgc accacccct tatgaagag acactagcat ggagtatgct ccgagcgctc caattgacaa
                                                M
      >.....<
        L K G K G K K S K K L G I A P P P Y E E D T S M E Y A P S A P I D

2601  atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt
                                                M
      >.....<
        K S Y F G V D E M D T Y D P N Q L R Y E K F F F T V K M T V R S N R
```

FIG.9D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
2701  ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt
      >.....M.....>
        P  F  R  T  Y  S  D  V  A  A  A  V  S  H  W  D  H  M  Y  I  G  M  A  G  K  R  P  F  Y  K  I  L  A

                                  a                                                                    a
2801  ttttgggttc ttctaatcta aaggccactc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa ggcagggctt atttgccaca
      >.....M.....>
        F  L  G  S  S  N  L  K  A  T  P  A  V  L  A  D  Q  G  Q  P  E  Y  H  A  H  C  E  G  R  A  Y  L  P
                                  N                                                                    T

2901  taggatgggg aagacccctc ccatgctcaa tgtaccagag cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc
      >.....M.....>
      H  R  M  G  K  T  P  P  M  L  N  V  P  E  H  F  R  R  P  F  N  I  G  L  Y  K  G  T  I  E  L  T  M  T

3001  atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc aaattttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc
      >.....M.....>
        I  Y  D  D  E  S  L  E  A  A  P  M  I  W  D  H  F  N  S  S  K  F  S  D  F  R  E  K  A  L  M  F  G

3101  tgattgtcga gaaaaaggca tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc ttctgaacaa tccccggttt
      >.....M.....>>
      L  I  V  E  K  K  A  S  G  A  W  V  L  D  S  I  G  H  F  K  -

3201  actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca
                                                                                  >>.....N.....>
                                                                                    M  S  V  T  V

3301  agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc
      >.....N.....>
      K  R  I  I  D  N  T  V  V  V  P  K  L  P  A  N  E  D  P  V  E  Y  P  A  D  Y  F  R  K  S  K  E  I
```

FIG.9E

120

```
3401  tctttacatc aatactacaa aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa tcatacatgt caacagctac
      >.....N.....<
        P  L  Y  I  N  I  T  K  S  L  S  D  L  R  G  Y  Y  V  Y  Q  C  L  K  S  G  N  V  S  I  I  H  V  N  S  Y

3501  ttgtatgggg cattaaagga catccgaggt aagttggata aagattggta ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg
      >.....N.....<
        L  Y  G  A  L  K  D  I  R  G  K  L  D  K  D  W  S  S  F  G  I  N  I  G  K  A  G  D  T  I  G  I  F

3601  accttgtatc ctgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact
      >.....N.....<
        D  L  V  S  L  K  A  L  D  G  V  L  P  D  G  V  S  D  A  S  R  T  S  A  D  D  K  W  L  P  L  Y  L

3701  tggcttatac agagtgggca gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa tgatcaatga acagtttgaa
      >.....N.....<
        L  G  L  Y  R  V  G  R  T  Q  M  P  E  Y  R  K  K  L  M  D  G  L  T  N  Q  C  K  M  I  N  E  Q  F  E

3801  cctcttgtac cagaaggtcg tgacatttct gatgtgtggg gaaatgacag taattacaca aaagttgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca
      >.....N.....<
        P  L  V  P  E  G  R  D  I  F  D  V  W  G  N  D  S  N  Y  T  K  I  V  A  A  V  D  M  F  F  H  M  F

3901  aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gactcattgt ttccagattc aaagattgtg ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccag
      >.....N.....<
        K  K  H  E  C  A  S  F  R  Y  G  T  I  V  S  R  F  K  D  C  A  A  L  A  T  F  G  H  L  C  K  I  T

4001  aatgtctaca gaagatgtaa cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc aagaattga caaggccgat
      >.....N.....<
        G  M  S  T  E  D  V  I  T  W  I  L  N  R  E  V  A  D  E  M  V  Q  M  M  L  P  G  Q  E  I  D  K  A  D
```

FIG.9F

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
4101  tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc
      >.....................................................N.....................................................>
        S  Y  M  P  Y  L  I  D  F  G  L  S  S  K  S  P  Y  S  S  V  K  N  P  A  F  H  F  W  G  Q  L  T  A

4201  ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg
      >.....................................................N.....................................................>
        L  L  L  R  S  T  R  A  R  N  A  R  Q  P  D  D  I  E  Y  T  S  L  T  T  A  G  L  L  Y  A  Y  A  V

4301  atcctctgcc gacttggcac aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga ctaatgcacc gccacaaggc
      >.....................................................N.....................................................>
      G  S  S  A  D  L  A  Q  Q  F  C  V  G  D  N  K  Y  T  P  D  D  S  T  G  G  L  T  T  N  A  P  P  Q  G

4401  agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag
      >.....................................................N.....................................................>
        R  D  V  V  E  W  L  G  W  F  E  D  Q  N  R  K  P  T  P  D  M  M  Q  Y  A  K  R  A  V  M  S  L  Q

4501  gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata attctcagat cacctattat atattatgct acatatgaaa
      >.....................N.....................>>
      G  L  R  E  K  T  I  G  K  Y  A  K  S  E  F  D  K  -

4601  aaaactaaca gagatcgatc tgtttacgcg tcactatgtt gtcttatcta atctttgcac ttgccgtttc gcccatttta ggcaaaattg aaattgtgtt
                                                >>.....................G.....................>
                                                  M  L  S  Y  L  I  F  A  L  A  V  S  P  I  L  G  K  I  E  I  V

4701  tcctcaacat accactgggg attggaagag agttccccat gaatataatt attgccctac cagcgcagac aagaactcac atgggactca aacaggaatc
      >.....................................................G.....................................................>
      F  P  Q  H  T  T  G  D  W  K  R  V  P  H  E  Y  N  Y  C  P  T  S  A  D  K  N  S  H  G  T  Q  T  G  I
```

FIG.9G

122

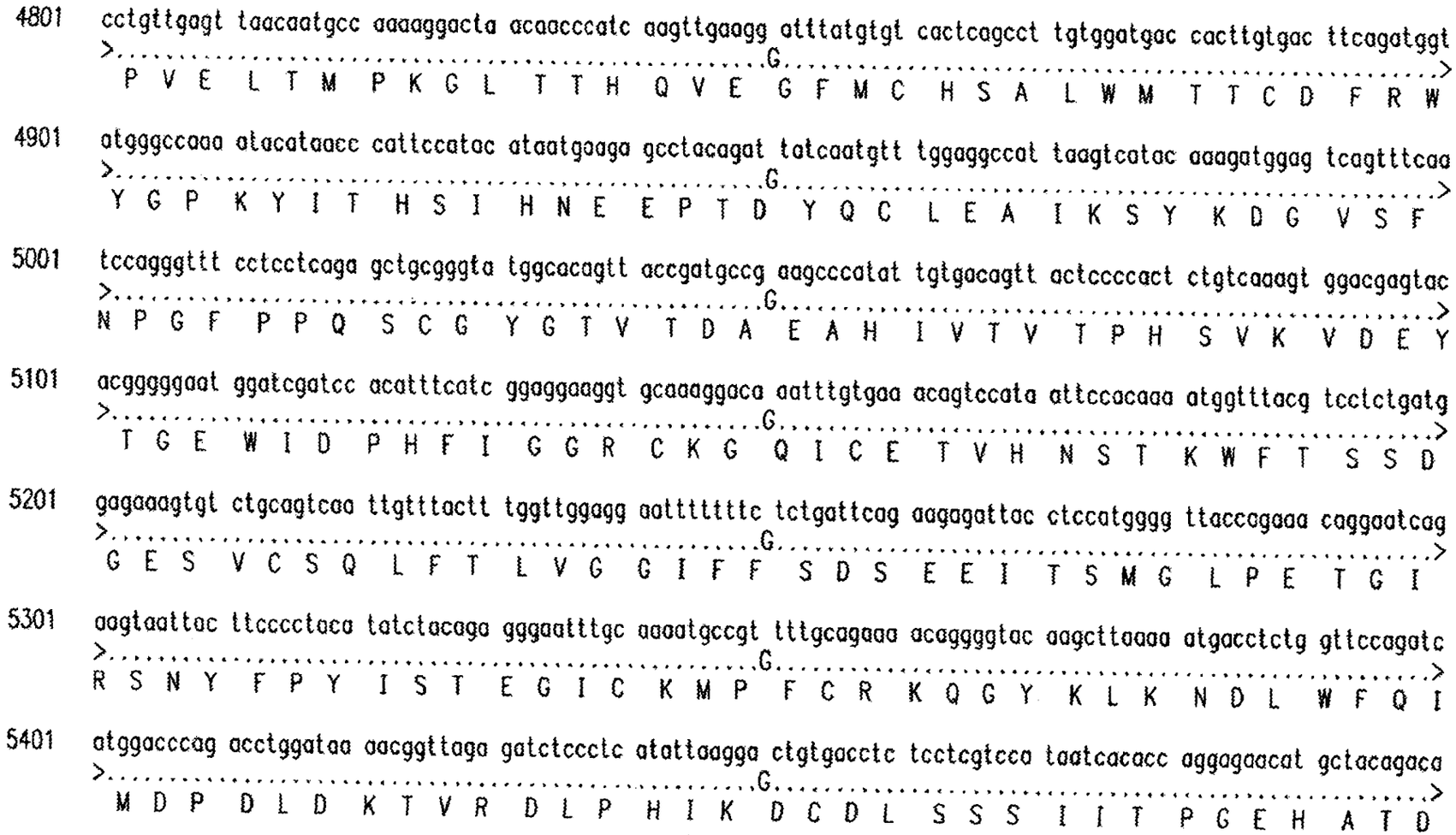


FIG.9H

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

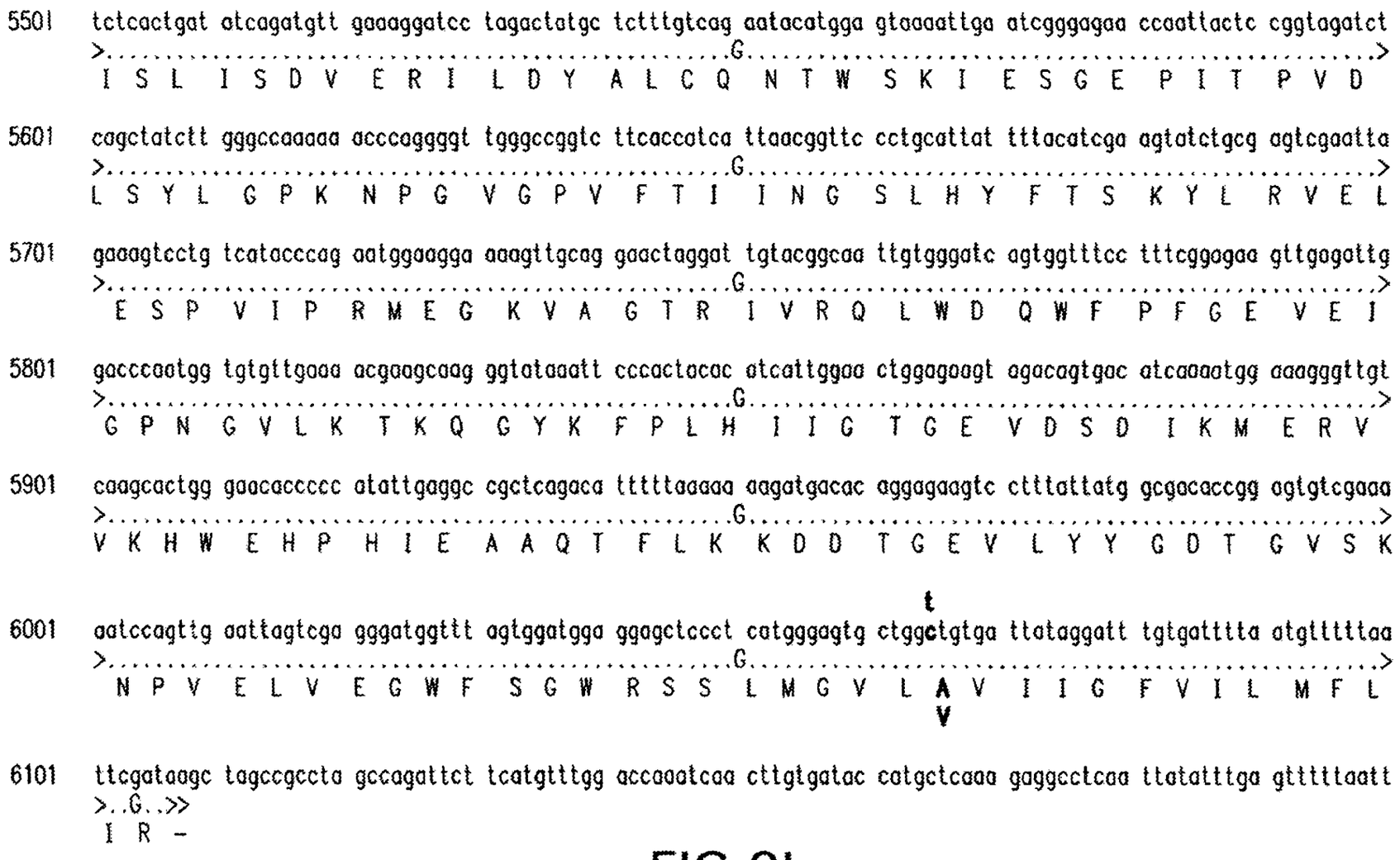


FIG.9I

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

124

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
6201  tttatgaaaa aaactaacag caatcatgga agtccacgat tttgagaccg acgagttcaa tgatttcaat gaagatgact atgccacaag agaattcctg
                                  >>.....................................L.....................................>
                                    M  E  V  H  D  F  E  T  D  E  F  N  D  F  N  E  D  D  Y  A  T  R  E  F  L

6301  aatcccgatg agcgcatgac gtacttgaat catgctgatt acaacctgaa ttctcctcta attagtgatg atattgacaa tttaatcagg aaattcaatt
      >.....................................................L.....................................................>
        N  P  D  E  R  M  T  Y  L  N  H  A  D  Y  N  L  N  S  P  L  I  S  D  D  I  D  N  L  I  R  K  F  N

6401  ctcttccaat tccctcgatg tgggatagta agaactggga tggagttctt gagatgttaa cgtcatgtca agccaatccc atcccaacat ctcagatgca
      >.....................................................L.....................................................>
        S  L  P  I  P  S  M  W  D  S  K  N  W  D  G  V  L  E  M  L  T  S  C  Q  A  N  P  I  P  T  S  Q  M

6501  taaatggatg ggaagttggt taatgtctga taatcatgat gccagtcaag ggtatagttt tttacatgaa gtggacaaag aggcagaaat aacatttgac
      >.....................................................L.....................................................>
      H  K  W  M  G  S  W  L  M  S  D  N  H  D  A  S  Q  G  Y  S  F  L  H  E  V  D  K  E  A  E  I  T  F  D

6601  gtggtggaga ccttcatccg cggctggggc aacaaaccaa ttgaatacat caaaaaggaa agatggactg actcattcaa aattctcgct tatttgtgtc
      >.....................................................L.....................................................>
        V  V  E  T  F  I  R  G  W  G  N  K  P  I  E  Y  I  K  K  E  R  W  T  D  S  F  K  I  L  A  Y  L  C

6701  aaaagttttt ggacttacac aagttgacat taatcttaaa tgctgtctct gaggtggaat tgctcaactt ggcgaggact ttcaaaggca aagtcagaag
      >.....................................................L.....................................................>
        Q  K  F  L  D  L  H  K  L  T  L  I  L  N  A  V  S  E  V  E  L  L  N  L  A  R  T  F  K  G  K  V  R

                                                                                                g
6801  aagttctcat ggaacgaaca tatgcaggat tagggttccc agcttgggtc ctacttttat ttcagaagga tgggcttact tcaaagaaact tgatattcta
      >.....................................................L.....................................................>
      R  S  S  H  G  T  N  I  C  R  I  R  V  P  S  L  G  P  T  F  I  S  E  G  W  A  Y  F  K  K  L  D  I  L
                                                                                          E
```

FIG.9J

125

```
6901  atggaccgaa actttctgtt aatggtcaaa gatgtgatta tagggaggat gcaaacggtg ctatccatgg tatgtagaat agacaacctg ttctcagagc
>.....L.....<
        M D R N F L L M V K D V I I G R M Q T V L S M V C R I D N L F S E

7001  aagacatctt ctccctctta aatatctaca gaattggaga taaaattgtg gagaggcagg gaaatttttc ttatgacttg attaaaatgg tggaaccgat
>.....L.....<
        Q D I F S L L N I Y R I G D K I V E R Q G N F S Y D L I K M V E P

7101  atgcaacttg aagctgatga aattagcaag agaatcaagg cctttagtcc cacaattccc tcatttgaa aatcatatca agacttctgt tgatgaaggg
>.....L.....<
        I C N L K L M K L A R E S R P L V P Q F P H F E N H I K T S V D E G

7201  gcaaaaattg accgaggtat aagattcctc catgatcaga taatgagtgt gaaaacagtg gatctcacac tggtgattta tggatgttc agacattggg
>.....L.....<
        A K I D R G I R F L H D Q I M S V K T V D L T L V I Y G S F R H W

7301  gtcatcattt tatagattat tacactggac tagaaaaatt acattcccaa gtaccatga agaaagatat tgatgtgtca tatgcaaaag cacttgcaag
>.....L.....<
        G H P F I D Y Y T G L E K L H S Q V T M K K D I D V S Y A K A L A

7401  tgatttagct cggatgttc tatttcaaca gttcaatgat cataaaaagt ggttcgtgaa tggagacttg ctccctcatg atcatccctt taaaagtcat
>.....L.....<
        S D L A R I V L F Q Q F N D H K K W F V N G D L L P H D H P F K S H

7501  gttaaagaaa atacatggcc cacagctgct caagttcaag attttggaga taaatggcat gaacttccgc tgattaatg ttttgaaata cccgacttac
>.....L.....<
        V K E N T W P T A A Q V Q D F G D K W H E L P L I K C F E I P D L
```

FIG.9K

```
7601  tagacccatc gataatatac tctgacaaaa gtcattcaat gaatagggtca gaggtgttga aacatgtccg aatgaatccg aacactccta tccctagtaa
>.....L.....>
 L  D  P  S  I  I  Y  S  D  K  S  H  S  M  N  R  S  E  V  L  K  H  V  R  M  N  P  N  T  P  I  P  S

7701  aaaggtgttg cagactatgt tggacacaaa ggctaccaat tggaaagaat ttcttaaaga gattgatgag aagggcttag atgatgatga tctaattatt
>.....L.....>
 K  K  V  L  Q  T  M  L  D  T  K  A  T  N  W  K  E  F  L  K  E  I  D  E  K  G  L  D  D  D  D  L  I  I

7801  ggtcttaaag gaaaggagag ggaactgaag ttggcaggta gatttttctc cctaatgtct tggaaattgc gagaatactt tgtaattacc gaatatttga
>.....L.....>
   G  L  K  G  K  E  R  E  L  K  L  A  G  R  F  F  S  L  M  S  W  K  L  R  E  Y  P  V  I  t  E  Y  L

7901  taaagactca tttcgtccct atgtttaaag gcctgacaat ggcggacgat ctaactgcag tcattaaaaa gatgttagat tcctcatccg gccaaggatt
>.....L.....>
 I  K  T  H  F  V  P  M  F  K  G  L  T  M  A  D  D  L  T  A  V  I  K  K  M  L  D  S  S  S  G  Q  G

8001  gaagtcatat gaggcaattt gcatagccaa tcacattgat tacgaaaaat ggaataacca ccaaaggaag ttatcaaacg gcccagtgtt ccgagttatg
>.....L.....>
 L  K  S  Y  E  A  I  C  I  A  N  H  I  D  Y  E  K  W  N  N  H  Q  R  K  L  S  N  G  P  V  F  R  V  M

8101  ggccagttct taggttatcc atccttaatc gagagaactc atgaatttit tgagaaaagt cttatatact acaatggaag accagacttg atgcgtgttc
>.....L.....>
   G  Q  F  L  G  Y  P  S  L  I  E  R  T  H  E  F  F  E  K  S  L  I  Y  Y  N  G  R  P  D  L  M  R  V

8201  acaacaacac actgatcaat tcaacctccc aacgagtttg ttggcaagga caagagggtg gactggaagg tctacggcaa aaaggatgga gtatcctcaa
>.....L.....>
 H  N  N  T  L  I  N  S  T  S  Q  R  V  C  W  Q  G  Q  E  G  G  L  E  G  L  R  Q  K  G  W  S  I  L
```

FIG.9L

```
8301  tctactggtt attcaaagag aggctaaaat cagaaacact gctgtcaaag tcttggcaca aggtgataat caagttattt gcacacagta taaaacgaag
      >.....L.....<
      N L L V I Q R E A K I R N T A V K V L A Q Q G D N Q V I C T Q Y K T K

8401  aaatcgaggaa acgttgtaga attacagggt gctctcaatc aaatggtttc taataatgag aaaattatga ctgcaatcaa aataggaaca gggaagttag
      >.....L.....<
        K S R N V V E L Q G A L N Q M V S N N E K I M T A I K I G T G K L

8501  gacttttgat aaatgacgat gagactatgc aatctgcaga ttacttgaat tatggaaaaa taccgatttt ccgtgggatg attagggagt tagaggaccaa
      >.....L.....<
        G L L I N D D E T M Q S A D Y L N Y G K I P I F R G V I R G L E T

8601  gagatggtca cgagtgactt gtgtcaccaa tgaccaaata cccacttgtg ctaatataat gagtcagtt tccacaaatg ctctcaccgt agctcatttt
      >.....L.....<
      K R W S R V T C V T N D Q I P T C A N I M S S V S T N A L T V A H F

8701  gctgaggacc caatcaatgc catgatacag tacaattatt ttgggacatt tgctagactc ttgttgatga tgcatgatcc tgctcttcgt caatcattgt
      >.....L.....<
        A E N P I N A M I Q Y N Y F G T F A R L L L M M H D P A L R Q S L

8801  atgaagttca agataagata ccgggcttgc acagttctac tttcaaatac gccatgttgt attggaccc ttccattgga gggatgtcgg gcatgtcttt
      >.....L.....<
      Y E V Q D K I P G L H S S T F K Y A M L Y L D P S I G G V S G M S

8901  gtccaggttt ttgattagag ccttcccaga tcccgtaaca gaaagtctct cattctggag attcatccat gtacatgctc gaagtgagca tctgaaggag
      >.....L.....<
      L S R F L I R A F P D P V T E S L S F W R F I H V H A R S E H L K E
```

FIG.9M

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
9001  atgagtgcag tatttggaaa ccccgagata gccaagtttc gaataactca catagacaag ctagtagaag atccaacctc tctgaacatc gctatgggaa
      >.....L.....>
        M  S  A  V  F  G  N  P  E  I  A  K  F  R  I  T  H  I  D  K  L  V  E  D  P  T  S  L  N  I  A  M  G

9101  tgagtccagc gaacttgtta aagactgagg ttaaaaaatg cttaatcgaa tcaagacaaa ccatcaggaa ccaggtgatt aaggatgcaa ccatatattt
      >.....L.....>
        M  S  P  A  N  L  L  K  T  E  V  K  K  C  L  I  E  S  R  Q  T  I  R  N  Q  V  I  K  D  A  T  I  Y

9201  gtatcatgaa gaggatcggc tcagaagttt cttatggtca ataaatcctc tgttccctag attttaagt gaattcaaat caggcacttt tttgggagtc
      >.....L.....>
        L  Y  H  E  E  D  R  L  R  S  F  L  W  S  I  N  P  L  F  P  R  F  L  S  E  F  K  S  G  T  F  L  G  V

9301  gcagacgggc tcatcagtct atttcaaaat tctcgtacta ttcggaactc ctttaagaaa aagtatcata gggaattgga tgatttgatt gtgaggagtg
      >.....L.....>
        A  D  G  L  I  S  L  F  Q  N  S  R  T  I  R  N  S  F  K  K  K  Y  H  R  E  L  D  D  L  I  V  R  S

9401  aggtatcctc tttgacacat ttagggaaac ttcatttgag aaggggatca tgtaaaatgt ggacatgttc agctactcat gctgacacat taagatacaa
      >.....L.....>
        E  V  S  S  L  T  H  L  G  K  L  H  L  R  R  G  S  C  K  M  W  T  C  S  A  T  H  A  D  T  L  R  Y

9501  atcctggggc cgtacagtta ttgggacaac tgtaccccat ccattagaaa tgttgggtcc acaacatcga aaagagactc cttgtgcacc atgtaacaca
      >.....L.....>
        K  S  W  G  R  T  V  I  G  T  T  V  P  H  P  L  E  M  L  G  P  Q  H  R  K  E  T  P  C  A  P  C  N  T

9601  tcagggttca attatgtttc tgtgcattgt ccagacggga tccatgacgt ctttagttca cggggaccat tgcctgctta tctagggtct aaaacatctg
      >.....L.....>
        S  G  F  N  Y  V  S  V  H  C  P  D  G  I  H  D  V  F  S  S  R  G  P  L  P  A  Y  L  G  S  K  T  S
```

FIG.9N

```
9701   aatctacatc tattttgcag ccttgggaaa gggaaagcaa agtcccactg attaaaagag ctacacgtct tagagatgct atctcttggt ttgttgaacc
       >.....L.....>
        E  S  T  S  I  L  Q  P  W  E  R  E  S  K  V  P  L  I  K  R  A  T  R  L  R  D  A  I  S  W  F  V  E

9801   cgactctaaa ctagcaatga ctatacttta taacatccac tctttaacag gcgaagaatg gaccaaaagg cagcatgggt tcaaaagaac agggtctgcc
       >.....L.....>
        P  D  S  K  L  A  M  T  I  L  S  N  I  H  S  L  T  G  E  E  W  T  K  R  Q  H  G  F  K  R  T  G  S  A

9901   cttcataggt tttcgacatc tcggatgagc catggtgggt tcgcatctca gagcactgca gcattgacca ggttgatggc aactacagac accatgaggg
       >.....L.....>
          L  H  R  F  S  T  S  R  M  S  H  G  G  F  A  S  Q  S  T  A  A  L  T  R  L  M  A  T  T  D  T  M  R

10001  atctgggaga tcagaatttc gacttttTat tccaagcaac gttgctctat gctcaaatta ccaccactgt tgcaagagac ggatggatca ccagttgtac
       >.....L.....>
        D  L  G  D  Q  N  F  D  F  L  F  Q  A  T  L  L  Y  A  Q  I  T  T  T  V  A  R  D  G  W  I  T  S  C

10101  agatcattat catattgcct gtaagtcctg tttgagaccc atagaagaga tcaccctgga ctcaagtatg gactacacgc ccccagatgt atcccatgtg
       >.....L.....>
        T  D  H  Y  H  I  A  C  K  S  C  L  R  P  I  E  E  I  T  L  D  S  S  M  D  Y  T  P  P  D  V  S  H  V

10201  ctgaagacat ggaggaatgg ggaaggttcg tggggacaag agataaaaca gatctatcct ttagaaggga attggaagaa tttagcacct gctgagcaat
       >.....L.....>
          L  K  T  W  R  N  G  E  G  S  W  G  Q  E  I  K  Q  I  Y  P  L  E  G  N  W  K  N  L  A  P  A  E  Q

10301  cctatcaagt cggcagatgt ataggtttTc tatatggaga cttggcgtat agaaaatcta ctcatgccga ggacagttct ctatttcctc tatctataca
       >.....L.....>
        S  Y  Q  V  G  R  C  I  G  F  L  Y  G  D  L  A  Y  R  K  S  T  H  A  E  D  S  S  L  F  P  L  S  I
```

FIG.90

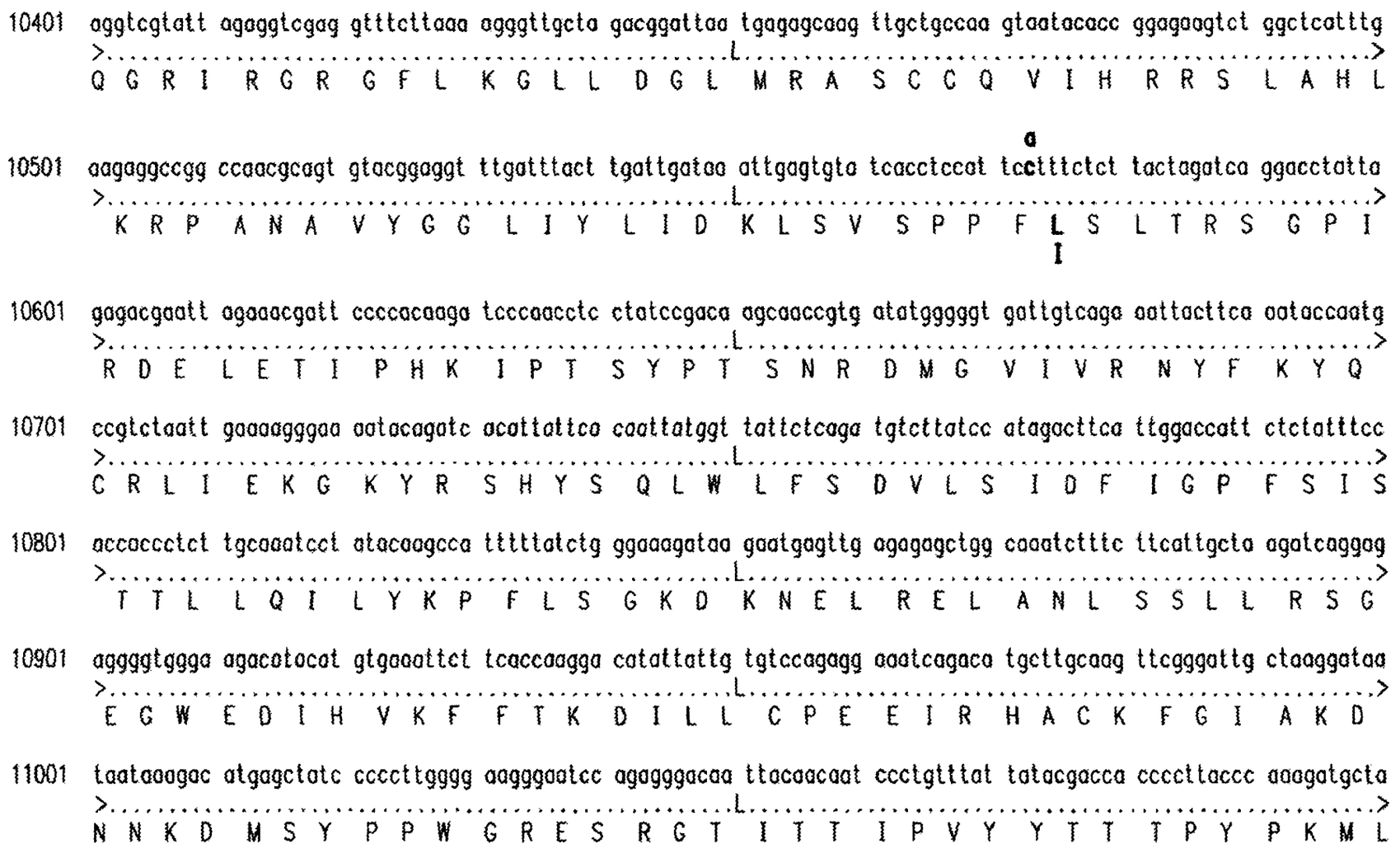


FIG.9P

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
11101  gagatgcctc caagaatcca aaatcccctg ctgtccggaa tcaggttggg ccaattacca actggcgctc attataaaat tcggagtata ttacatggaa
       >.....................................................L.....................................................>
         E  M  P  P  R  I  Q  N  P  L  L  S  G  I  R  L  G  Q  L  P  T  G  A  H  Y  K  I  R  S  I  L  H  G

11201  tgggaatcca ttacagggac ttcttgagtt gtggagacgg ctccggaggg atgactgctg cattactacg agaaaatgtg catagcagag gaatattcaa
       >.....................................................L.....................................................>
         M  G  I  H  Y  R  D  F  L  S  C  G  D  G  S  G  G  M  T  A  A  L  L  R  E  N  V  H  S  R  G  I  F

11301  tagtctgtta gaattatcag ggtcagtcat gcgaggcgcc tctcctgagc cccccagtgc cctagaaact ttaggaggag ataaatcgag atgtgtaaat
       >.....................................................L.....................................................>
       N  S  L  L  E  L  S  G  S  V  M  R  G  A  S  P  E  P  P  S  A  L  E  T  L  G  G  D  K  S  R  C  V  N

11401  ggtgaaacat gttgggaata tccatctgac ttatgtgacc caaggacttg ggactatttc ctccgactca aagcaggctt ggggcttcaa attgatttaa
       >.....................................................L.....................................................>
         G  E  T  C  W  E  Y  P  S  D  L  C  D  P  R  T  W  D  Y  F  L  R  L  K  A  G  L  G  L  Q  I  D  L


11501  ttgtaatgga tatggaagtt cgggattctt ctactagcct gaaaattgag acgaatgtta gaaattatgt gcaccggatt ttggatgagc aaggagtttt
       >.....................................................L.....................................................>
         I  V  H  D  M  E  V  R  D  S  S  T  S  L  K  I  E  T  N  V  R  N  Y  V  H  R  I  L  D  E  Q  G  V

11601  aatctacaag acttatggaa catatatttg tgagagcgaa aagaatgcag taacaatcct tggtcccatg ttcaagacgg tcgacttagt tcaaacagaa
       >.....................................................L.....................................................>
       L  I  Y  K  T  Y  G  T  Y  I  C  E  S  E  K  N  A  V  T  I  L  G  P  M  F  K  T  V  D  L  V  Q  T  E

11701  tttagtagtt ctcaaacgtc tgaagtatat atggtatgta aaggtttgaa gaaattaatc gatgaaccca atcccgattg gtcttccatc aatgaatcct
       >.....................................................L.....................................................>
         F  S  S  S  Q  T  S  E  V  Y  M  V  C  K  G  L  K  K  L  I  D  E  P  N  P  D  W  S  S  I  N  E  S
```

FIG.9Q

132

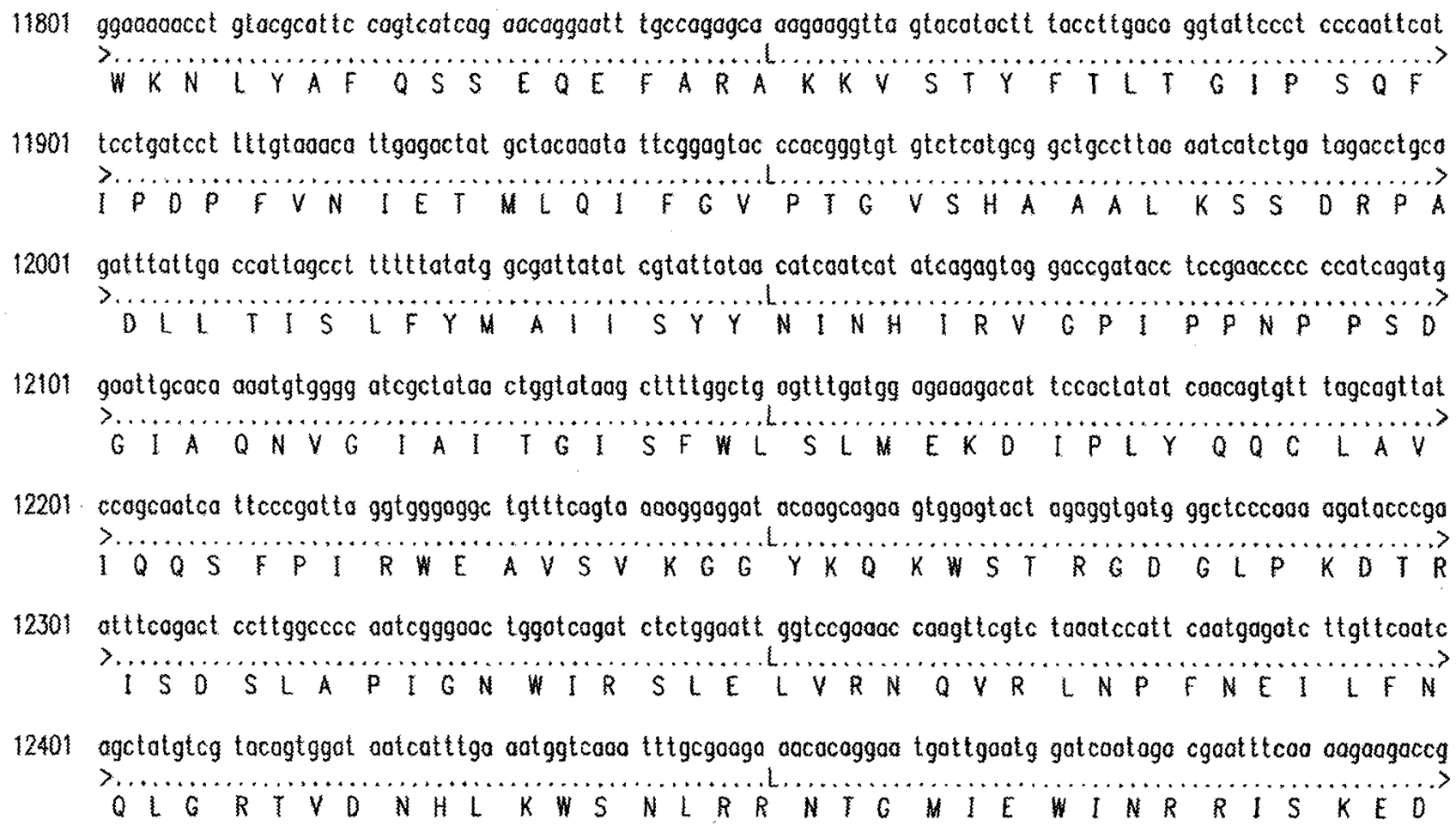


FIG.9R

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```
12501  gtctatactg atgttgaaga gtgacctaca cgaggaaac tcttggagag attaaaaat catgaggaga ctccaaactt taagtatgaa aaaaactttg
       >..........................L..........................>>
       R S I L  M L K  S D L  H E E N  S W R  D -

12601   atccttaaga ccctcttgtg gtttttattt tttatctggt tttgtggtct tcg
```

FIG.9S

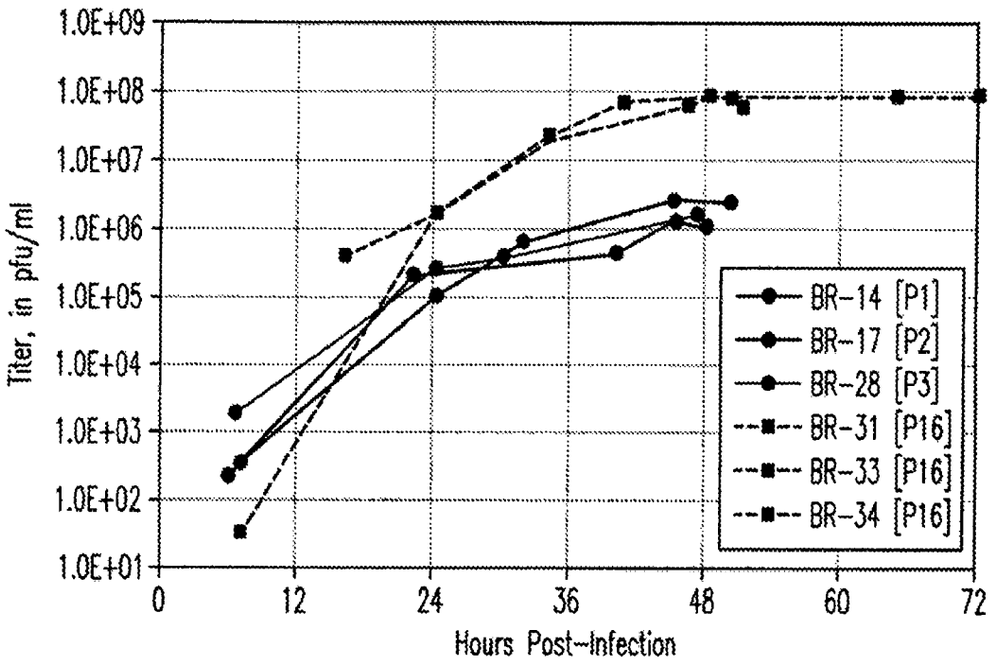

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
Titer, in pfu/ml
0
12
24
36
48
60
72
Hours Post-Infection
BR-14 [P1]
BR-17 [P2]
BR-28 [P3]
BR-31 [P16]
BR-33 [P16]
BR-34 [P16]

FIG.10

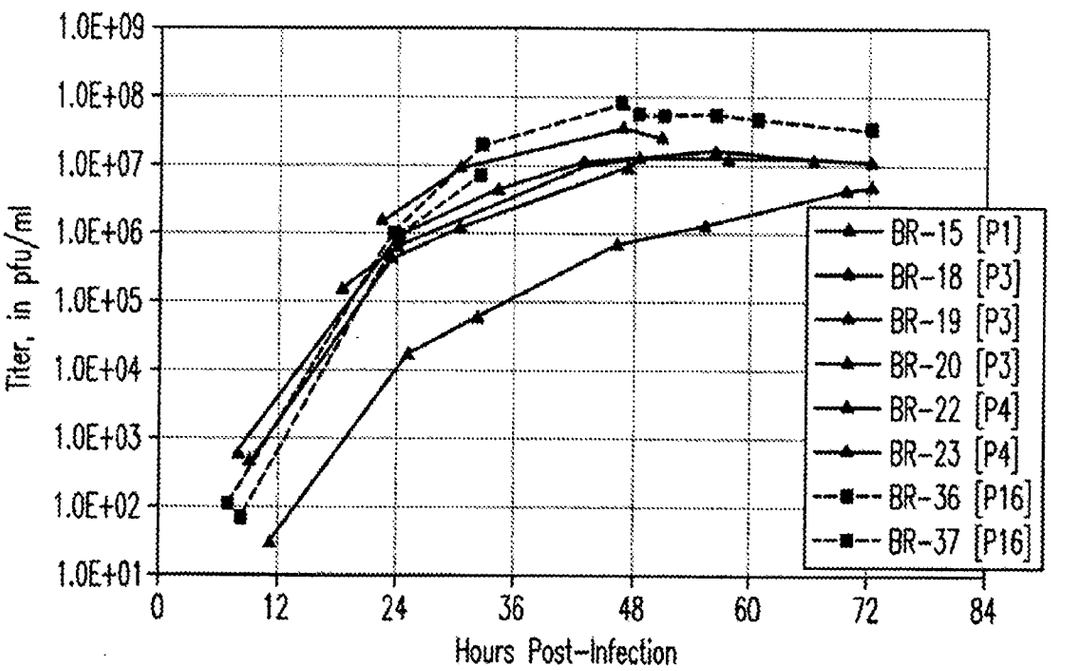

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
Titer, in pfu/ml
0
12
24
36
48
60
72
84
Hours Post-Infection
BR-15 [P1]
BR-18 [P3]
BR-19 [P3]
BR-20 [P3]
BR-22 [P4]
BR-23 [P4]
BR-36 [P16]
BR-37 [P16]

FIG.11

Sequence Listing

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> Genetically Modified Attenuated Vesicular Stomatitis Virus, Compositions and Methods of Use Thereof

<130> AM102885

<150> 61/015,868
<151> 2007-12-21

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 15732
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 1

acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc 60

aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgatggg 120

aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg 180

caagcaggga gctagaacga ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct 240

gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat 300

cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca 360

ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa aagtaagaaa aaagcacagc 420

aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga 480

acatccaggg gcaaatggta catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa 540

aagtagtaga agagaaggct ttcagcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag 600

aaggagccac cccacaagat ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag 660

ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc agaatgggat agagtgcatc 720

cagtgcatgc agggcctatt gcaccaggcc agatgagaga accaagggga agtgacatag 780

caggaactac tagtaccctt caggaacaaa taggatggat gacaaataat ccacctatcc 840

cagtaggaga aatttataaa agatggataa tcctgggatt aaataaaata gtaagaatgt 900

atagccctac cagcattctg gacataagac aaggaccaaa agaacccttt agagactatg 960

tagaccggtt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc acaggaggta aaaaattgga 1020

tgacagaaac cttgttggtc caaaatgcga acccaaattg taagactatt ttaaaagcat 1080

tgggaccagc ggctacacta gaagaaatga tgacagcatg tcagggagta ggaggacccg 1140

gccataaggc aagagttttg gctgaagcaa tgagccaagt aacaaattca gctaccataa 1200

tgatgcagag aggcaatttt aggaaccaaa gaaagattgt taagtgtttc aattgtggca 1260

aagaagggca cacagccaga aattgcaggg cccctaggaa aaagggctgt tggaaatgtg 1320

gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga 1380

tctggccttc ctacaaggga aggccaggga attttcttca gagcagacca gagccaacag 1440

ccccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactcccccc cagaagcagg 1500

agccgataga caaggaactg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcaacgacc 1560

cctcgtcaca ataatcgcta gcatattatg ctacatatga aaaaaactaa cagatatcat 1620

ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcggt 1680

aggagagata gatgagatcg aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca 1740

agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga 1800

cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc 1860

tgagcaagtt gaaggcttta tacaggggcc tttagatgac tatgcagatg aggaagtgga 1920

tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac 1980

cttacggttg acatcgccag agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac 2040

gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc 2100

atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac 2160

tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta tcagatgttt ggtctctctc 2220

aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt 2280

ggatgaattg ttctcatcta gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc 2340

tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt 2400

caaatattct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc 2460

aatccattca tcatgagttc cttaaagaag attctcggtc tgaaggggaa aggtaagaaa 2520

tctaagaaat tagggatcgc accacccccc tatgaagagg acactagcat ggagtatgct 2580

ccgagcgctc caattgacaa atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg 2640

aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt 2700

ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc 2760

ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt ttttgggttc ttctaatcta 2820

aaggccactc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa 2880

ggcagggctt atttgcaaca taggatgggg aagacccctc ccatgctcaa tgtaccagag 2940

cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc 3000

atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc 3060

aaattttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc tgattgtcga gaaaaaggca 3120

tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc 3180

ttctgaacaa tccccggttt actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata 3240

tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca 3300

agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg 3360

aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc tctttacatc aatactacaa 3420

aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa 3480

tcatacatgt caacagctac ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata 3540

aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg 3600

accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca 3660

gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact tggcttatac agagtgggca 3720

gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa 3780

tgatcaatga acagtttgaa cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg 3840

gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca 3900

aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg 3960

ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg aatgtctaca gaagatgtaa 4020

cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc 4080

aagaaattga caaggccgat tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta 4140

agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc 4200

ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat 4260

ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg atcctctgcc gacttggcac 4320

aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga 4380

ctaatgcacc gccacaaggc agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa 4440

acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag 4500

gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata 4560

attctcagat cacctattat atattatgct acatatgaaa aaaactaaca gagatcgatc 4620

tgtttacgcg tcactatgaa gtgccttttg tacttagcct ttttattcat tggggtgaat 4680

tgcaagttca ccatagtttt tccacacaac caaaaaggaa actggaaaaa tgttccttct 4740

aattaccatt attgcccgtc aagctcagat ttaaattggc ataatgactt aataggcaca 4800

gccttacaag tcaaaatgcc caagagtcac aaggctattc gagcagacgg ttggatgtgt 4860

catgcttcca aatgggtcac tacttgtgat ttccgttggt atggaccgaa gtatataaca 4920

cattccatcc gatccttcac tccatctgta gaacaatgca atgaaagcat tgaacaaacg 4980

aaacaaggaa cttggctgaa tccaggcttc cctcctcaaa gttgtggata tgcaactgtg 5040

acggatgccg aagcagtgat tgtccaggtg actcctcacc atgtgctggt tgatgaatac 5100

acaggagaat gggttgattc acagttcatc aacggaaaat gcagcaatta catatgcccc 5160

actgtccata actctacaac ctggcattct gactataagg tcaaagggct atgtgattct 5220

aacctcattt ccatggacat caccttcttc tcagaggacg gagagctatc atccctggga 5280

aaggagggca cagggttcag aagtacctac tttgcttatg aaactggagg caaggcctgc 5340

aaaatgcaat actgcaagca ttggggagtc agactcccat caggtgtctg gttcgagatg 5400

gctgataagg atctctttgc tgcagccaga ttccctgaat gcccagaagg gtcaagtatc 5460

tctgctccat ctcagacctc agtggatgta agtctaattc aggacgttga gaggatcttg 5520

gattattccc tctgccaaga aacctggagc aaaatcagag cgggtcttcc aatctctcca 5580

gtggatctca gctatcttgc tcctaaaaac ccaggaaccg gtcctgcttt caccataatc 5640

aatggtaccc taaaatactt tgagaccaga tacatcagag tcgatattgc tgctccaatc 5700

ctctcaagaa tggtcggaat gatcagtgga actaccacag aaagggaact gtgggatgac 5760

tgggcaccat atgaagacgt ggaaattgga cccaatggag ttctgaggac cagttcagga 5820

tataagtttc ctttatacat gattggacat ggtatgttgg actccgatct tcatcttagc 5880

tcaaaggctc aggtgttcga acatcctcac attcaagacg ctgcttcgca acttcctgat 5940

gatgagattt tatttttgg tgatactggg ctatccaaaa atccaatcga gcttgtagaa 6000

ggttggttca gtagttggaa aagctctatt gcctcttttt tctttatcat agggttaatc 6060

attgtactat tcttggttct ccgataagct agccgcctag ccagattctt catgtttgga 6120

ccaaatcaac ttgtgatacc atgctcaaag aggcctcaat tatatttgag tttttaattt 6180

ttatgaaaaa aactaacagc aatcatggaa gtccacgatt ttgagaccga cgagttcaat 6240

gatttcaatg aagatgacta tgccacaaga gaattcctga atcccgatga gcgcatgacg 6300

tacttgaatc atgctgatta caacctgaat tctcctctaa ttagtgatga tattgacaat 6360

ttaatcagga aattcaattc tcttccaatt ccctcgatgt gggatagtaa gaactgggat 6420

ggagttcttg agatgttaac gtcatgtcaa gccaatccca tcccaacatc tcagatgcat 6480

aaatggatgg gaagttggtt aatgtctgat aatcatgatg ccagtcaagg gtatagtttt 6540

ttacatgaag tggacaaaga ggcagaaata acatttgacg tggtggagac cttcatccgc 6600

ggctggggca acaaaccaat tgaatacatc aaaaaggaaa gatggactga ctcattcaaa 6660

attctcgctt atttgtgtca aaagtttttg gacttacaca agttgacatt aatcttaaat 6720

gctgtctctg aggtggaatt gctcaacttg gcgaggactt tcaaaggcaa agtcagaaga 6780

agttctcatg gaacgaacat atgcaggatt agggttctca gcttgggtcc tacttttatt 6840

tcagaaggat gggcttactt caagaaactt gatattctaa tggaccgaaa ctttctgtta 6900

atggtcaaag atgtgattat agggaggatg caaacggtgc tatccatggt atgtagaata 6960

gacaacctgt tctcagagca agacatcttc tcccttctaa atatctacag aattggagat 7020

aaaattgtgg agaggcaggg aaatttttct tatgacttga ttaaaatggt ggaaccgata 7080

tgcaacttga agctaatgaa attagcaaga gaatcaaggc ctttagtccc acaattccct 7140

cattttgaaa atcatatcaa gacttctgtt gatgaagggg caaaaattga ccgaggtata 7200

agattcctcc atgatcagat aatgagtgtg aaaacagtgg atctcacact ggtgatttat 7260

ggatcgttca gacattgggg tcatcctttt atagattatt acactggact agaaaaatta 7320

cattcccaag taaccatgaa gaaagatatt gatgtgtcat atgcaaaagc acttgcaagt 7380

gatttagctc ggattgttct atttcaacag ttcaatgatc ataaaaagtg gttcgtgaat 7440

ggagacttgc tccctcatga tcatcccttt aaaagtcatg ttaaagaaaa tacatggccc 7500

acagctgctc aagttcaaga ttttggagat aaatggcatg aacttccgct gattaaatgt 7560

tttgaaatac ccgacttact agacccatcg ataatatact ctgacaaaag tcattcaatg 7620

aataggtcag aggtgttgaa acatgtccga atgaatccga acactcctat ccctagtaaa 7680

aaggtgttgc agactatgtt ggacacaaag gctaccaatt ggaaagaatt tcttaaagag 7740

attgatgaga agggcttaga tgatgatgat ctaattattg gtcttaaagg aaaggagagg 7800

gaactgaagt tggcaggtag atttttctcc ctaatgtctt ggaaattgcg agaatacttt 7860

gtaattaccg aatatttgat aaagactcat ttcgtcccta tgtttaaagg cctgacaatg 7920

gcggacgatc taactgcagt cattaaaaag atgttagatt cctcatccgg ccaaggattg 7980

aagtcatatg aggcaatttg catagccaat cacattgatt acgaaaaatg gaataaccac 8040

caaaggaagt tatcaaacgg cccagtgttc cgagttatgg gccagttctt aggttatcca 8100

tccttaatcg agagaactca tgaatttttt gagaaaagtc ttatatacta caatggaaga 8160

ccagacttga tgcgtgttca caacaacaca ctgatcaatt caacctccca acgagtttgt 8220

tggcaaggac aagagggtgg actggaaggt ctacggcaaa aaggatggag tatcctcaat 8280

ctactggtta ttcaaagaga ggctaaaatc agaaacactg ctgtcaaagt cttggcacaa 8340

ggtgataatc aagttatttg cacacagtat aaaacgaaga aatcgagaaa cgttgtagaa 8400

ttacagggtg ctctcaatca aatggtttct aataatgaga aaattatgac tgcaatcaaa 8460

atagggacag ggaagttagg acttttgata aatgacgatg agactatgca atctgcagat 8520

tacttgaatt atggaaaaat accgattttc cgtggagtga ttagagggtt agagaccaag 8580

agatggtcac gagtgacttg tgtcaccaat gaccaaatac ccacttgtgc taatataatg 8640

agctcagttt ccacaaatgc tctcaccgta gctcattttg ctgagaaccc aatcaatgcc 8700

atgatacagt acaattattt tgggacattt gctagactct tgttgatgat gcatgatcct 8760

gctcttcgtc aatcattgta tgaagttcaa gataagatac cgggcttgca cagttctact 8820

ttcaaatacg ccatgttgta tttggaccct tccattggag gagtgtcggg catgtctttg 8880

tccaggtttt tgattagagc cttcccagat cccgtaacag aaagtctctc attctggaga 8940

ttcatccatg tacatgctcg aagtgagcat ctgaaggaga tgagtgcagt atttggaaac 9000

cccgagatag ccaagtttcg aataactcac atagacaagc tagtagaaga tccaacctct 9060

ctgaacatcg ctatgggaat gagtccagcg aacttgttaa agactgaggt taaaaaatgc 9120

ttaatcgaat caagacaaac catcaggaac caggtgatta aggatgcaac catatatttg 9180

tatcatgaag aggatcggct cagaagtttc ttatggtcaa taaatcctct gttccctaga 9240

tttttaagtg aattcaaatc aggcactttt ttgggagtcg cagacgggct catcagtcta 9300

tttcaaaatt ctcgtactat tcggaactcc tttaagaaaa agtatcatag ggaattggat 9360

gatttgattg tgaggagtga ggtatcctct ttgacacatt tagggaaact tcatttgaga 9420

aggggatcat gtaaaatgtg gacatgttca gctactcatg ctgacacatt aagatacaaa 9480

tcctggggcc gtacagttat tgggacaact gtaccccatc cattagaaat gttgggtcca 9540

caacatcgaa aagagactcc ttgtgcacca tgtaacacat cagggttcaa ttatgtttct 9600

gtgcattgtc cagacgggat ccatgacgtc tttagttcac ggggaccatt gcctgcttat 9660

ctagggtcta aaacatctga atctacatct attttgcagc cttgggaaag ggaaagcaaa 9720

gtcccactga ttaaaagagc tacacgtctt agagatgcta tctcttggtt tgttgaaccc 9780

gactctaaac tagcaatgac tatactttct aacatccact ctttaacagg cgaagaatgg 9840

accaaaaggc agcatgggtt caaaagaaca gggtctgccc ttcataggtt ttcgacatct 9900

cggatgagcc atggtgggtt cgcatctcag agcactgcag cattgaccag gttgatggca 9960

actacagaca ccatgaggga tctgggagat cagaatttcg acttttttatt ccaagcaacg 10020

ttgctctatg ctcaaattac caccactgtt gcaagagacg gatggatcac cagttgtaca 10080

gatcattatc atattgcctg taagtcctgt ttgagaccca tagaagagat caccctggac 10140

tcaagtatgg actacacgcc cccagatgta tcccatgtgc tgaagacatg gaggaatggg 10200

gaaggttcgt ggggacaaga gataaaacag atctatcctt tagaagggaa ttggaagaat 10260

ttagcacctg ctgagcaatc ctatcaagtc ggcagatgta taggttttct atatggagac 10320

ttggcgtata gaaaatctac tcatgccgag gacagttctc tatttcctct atctatacaa 10380

ggtcgtatta gaggtcgagg tttcttaaaa gggttgctag acggattaat gagagcaagt 10440

tgctgccaag taatacaccg gagaagtctg gctcatttga agaggccggc caacgcagtg 10500

tacggaggtt tgatttactt gattgataaa ttgagtgtat cacctccatt cctttctctt 10560

actagatcag gacctattag agacgaatta gaaacgattc cccacaagat cccaacctcc 10620

tatccgacaa gcaaccgtga tatgggggtg attgtcagaa attacttcaa ataccaatgc 10680

cgtctaattg aaaagggaaa atacagatca cattattcac aattatggtt attctcagat 10740

gtcttatcca tagacttcat tggaccattc tctatttcca ccaccctctt gcaaatccta 10800

tacaagccat ttttatctgg gaaagataag aatgagttga gagagctggc aaatctttct 10860

tcattgctaa gatcaggaga ggggtgggaa gacatacatg tgaaattctt caccaaggac 10920

atattattgt gtccagagga aatcagacat gcttgcaagt tcgggattgc taaggataat 10980

aataaagaca tgagctatcc cccttgggga agggaatcca gagggacaat tacaacaatc 11040

cctgtttatt atacgaccac cccttaccca aagatgctag agatgcctcc aagaatccaa 11100

aatcccctgc tgtccggaat caggttgggc caattaccaa ctggcgctca ttataaaatt 11160

cggagtatat tacatggaat gggaatccat tacagggact tcttgagttg tggagacggc 11220

tccggaggga tgactgctgc attactacga gaaaatgtgc atagcagagg aatattcaat 11280

agtctgttag aattatcagg gtcagtcatg cgaggcgcct ctcctgagcc ccccagtgcc 11340

ctagaaactt taggaggaga taaatcgaga tgtgtaaatg gtgaaacatg ttgggaatat 11400

ccatctgact tatgtgaccc aaggacttgg gactatttcc tccgactcaa agcaggcttg 11460

gggcttcaaa ttgatttaat tgtaatggat atggaagttc gggattcttc tactagcctg 11520

aaaattgaga cgaatgttag aaattatgtg caccggattt tggatgagca aggagtttta 11580

atctacaaga cttatggaac atatatttgt gagagcgaaa agaatgcagt aacaatcctt 11640

ggtcccatgt tcaagacggt cgacttagtt caaacagaat ttagtagttc tcaaacgtct 11700

gaagtatata tggtatgtaa aggtttgaag aaattaatcg atgaacccaa tcccgattgg 11760

tcttccatca atgaatcctg gaaaaacctg tacgcattcc agtcatcaga acaggaattt 11820

gccagagcaa agaaggttag tacatacttt accttgacag gtattccctc ccaattcatt 11880

cctgatcctt ttgtaaacat tgagactatg ctacaaatat tcggagtacc cacgggtgtg 11940

tctcatgcgg ctgccttaaa atcatctgat agacctgcag atttattgac cattagcctt 12000

ttttatatgg cgattatatc gtattataac atcaatcata tcagagtagg accgatacct 12060

ccgaaccccc catcagatgg aattgcacaa aatgtgggga tcgctataac tggtataagc 12120

ttttggctga gtttgatgga gaaagacatt ccactatatc aacagtgttt agcagttatc 12180

cagcaatcat tcccgattag gtgggaggct gtttcagtaa aaggaggata caagcagaag 12240

tggagtacta gaggtgatgg gctcccaaaa gatacccgaa tttcagactc cttggcccca 12300

atcgggaact ggatcagatc tctggaattg gtccgaaacc aagttcgtct aaatccattc 12360

aatgagatct tgttcaatca gctatgtcgt acagtggata atcatttgaa atggtcaaat 12420

ttgcgaagaa acacaggaat gattgaatgg atcaatagac gaatttcaaa agaagaccgg 12480

tctatactga tgttgaagag tgacctacac gaggaaaact cttggagaga ttaaaaaatc 12540

atgaggagac tccaaacttt aagtatgaaa aaaactttga tccttaagac cctcttgtgg 12600

tttttatttt tttatctggt tttgtggtct tcgtgggtcg gcatggcatc tccacctcct 12660

cgcggtccga cctgggcatc cgaaggagga cgtcgtccac tcggatggct aagggagggg 12720

cccccgcggg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga 12780

gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa 12840

aggaggaact atatccggat cgagacctcg atactagtgc ggtggagctc cagcttttgt 12900

tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg 12960

tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa 13020

gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct 13080

ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 13140

ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc 13200

gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa 13260

tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 13320

aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 13380

aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 13440

cccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 13500

tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 13560

agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 13620

gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta 13680

tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 13740

acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 13800

tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 13860

caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 13920

aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 13980

aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 14040

ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 14100

agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 14160

atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 14220

cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 14280

aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc 14340

cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc 14400

aacgttgttg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 14460

ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa 14520

gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 14580

ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 14640

tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 14700

tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 14760

ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 14820

tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 14880

agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg 14940

acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 15000

ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 15060

gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctaaattgt aagcgttaat attttgttaa 15120

aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa ccaataggcc gaaatcggca 15180

aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttgga 15240

acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc 15300

agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag ttttttgggg tcgaggtgcc 15360

gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt tagagcttga cggggaaagc 15420

cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg agcgggcgct agggcgctgg 15480

caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc cgcgcttaat gcgccgctac 15540

agggcgcgtc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg 15600

cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg 15660

taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatacg 15720

actcactata gg 15732

<210> 2
<211> 4007
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 2

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

```
Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
                245                 250                 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
            260                 265                 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
        275                 280                 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
    290                 295                 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305                 310                 315                 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
            340                 345                 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
        355                 360                 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
    370                 375                 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385                 390                 395                 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
                405                 410                 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
            420                 425                 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
        435                 440                 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
    450                 455                 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465                 470                 475                 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
                485                 490                 495
```

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

```
Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys
    770                 775                 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785                 790                 795                 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
                805                 810                 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
            820                 825                 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
        835                 840                 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
    850                 855                 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865                 870                 875                 880

Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr
                885                 890                 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg Met Gly Lys
            900                 905                 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
        915                 920                 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
    930                 935                 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945                 950                 955                 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
                965                 970                 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
            980                 985                 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys  Arg Ile Ile Asp Asn  Thr Val Val
        995                 1000                1005

Val Pro  Lys Leu Pro Ala Asn  Glu Asp Pro Val Glu  Tyr Pro Ala
    1010                1015                1020

Asp Tyr  Phe Arg Lys Ser Lys  Glu Ile Pro Leu Tyr  Ile Asn Thr
    1025                1030                1035
```

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys
1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg
1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu
1400 1405 1410

Phe Asp Lys Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly
1415 1420 1425

Val Asn Cys Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly
1430 1435 1440

Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser
1445 1450 1455

Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln
1460 1465 1470

Val Lys Met Pro Lys Ser His Lys Ala Ile Arg Ala Asp Gly Trp
1475 1480 1485

Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp
1490 1495 1500

Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro
1505 1510 1515

Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly
1520 1525 1530

Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala
1535 1540 1545

Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His
1550 1555 1560

His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln
1565 1570 1575

Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His
1580 1585 1590

Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys
1595 1600 1605

Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
1610 1615 1620

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser
1625 1630 1635

Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln
1640 1645 1650

Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe
1655 1660 1665

Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu
1670 1675 1680

Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val
1685 1690 1695

Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser
1700 1705 1710

Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile
1715 1720 1725

Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr
1730 1735 1740

Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu
1745 1750 1755

Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg
1760 1765 1770

Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp
1775 1780 1785

Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly
1790 1795 1800

Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile
1805 1810 1815

Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala
1820 1825 1830

Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu
1835 1840 1845

Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
1850 1855 1860

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
1865 1870 1875

Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu
1880 1885 1890

Phe Leu Val Leu Arg Met Glu Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu
1895 1900 1905

Phe Asn Asp Phe Asn Glu Asp Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu
1910 1915 1920

Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn
1925 1930 1935

Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg
1940 1945 1950

Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn
1955 1960 1965

Trp Asp Gly Val Leu Glu Met Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro
1970 1975 1980

Ile Pro Thr Ser Gln Met His Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met
1985 1990 1995

Ser Asp Asn His Asp Ala Ser Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu
2000 2005 2010

Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe
2015 2020 2025

Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu
2030 2035 2040

Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys
2045 2050 2055

Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser
2060 2065 2070

Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val
2075 2080 2085

Arg Arg Ser Ser His Gly Thr Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro
2090 2095 2100

Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys
2105 2110 2115

Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys
2120 2125 2130

Asp Val Ile Ile Gly Arg Met Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys
2135 2140 2145

Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu
2150 2155 2160

Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn
2165 2170 2175

Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu
2180 2185 2190

Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln
2195 2200 2205

Phe Pro His Phe Glu Asn His Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly
2210 2215 2220

Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met
2225 2230 2235

Ser Val Lys Thr Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe
2240 2245 2250

Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu
2255 2260 2265

Lys Leu His Ser Gln Val Thr Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser
2270 2275 2280

Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe
2285 2290 2295

Gln Gln Phe Asn Asp His Lys Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu
2300 2305 2310

Leu Pro His Asp His Pro Phe Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr
2315 2320 2325

Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His
2330 2335 2340

Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp
2345 2350 2355

Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser
2360 2365 2370

Glu Val Leu Lys His Val Arg Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro
2375 2380 2385

Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn
2390 2395 2400

Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp
2405 2410 2415

Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys
2420 2425 2430

Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu
2435 2440 2445

Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro
2450 2455 2460

Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile
2465 2470 2475

Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr
2480 2485 2490

Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn
2495 2500 2505

Asn His Gln Arg Lys Leu Ser Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met
2510 2515 2520

Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu
2525 2530 2535

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu
2540 2545 2550

Met Arg Val His Asn Asn Thr Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg
2555 2560 2565

Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln
2570 2575 2580

Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala
2585 2590 2595

Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn
2600 2605 2610

Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val
2615 2620 2625

Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu
2630 2635 2640

Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu
2645 2650 2655

Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn
2660 2665 2670

Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu
2675 2680 2685

Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile
2690 2695 2700

Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu
2705 2710 2715

Thr Val Ala His Phe Ala Glu Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln
2720 2725 2730

Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His
2735 2740 2745

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile
2750 2755 2760

Pro Gly Leu His Ser Ser Thr Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu
2765 2770 2775

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe
2780 2785 2790

Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe
2795 2800 2805

Trp Arg Phe Ile His Val His Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu
2810 2815 2820

Met Ser Ala Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile
2825 2830 2835

Thr His Ile Asp Lys Leu Val Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile
2840 2845 2850

Ala Met Gly Met Ser Pro Ala Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys
2855 2860 2865

Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile
2870 2875 2880

Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg
2885 2890 2895

Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser
2900 2905 2910

Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile
2915 2920 2925

Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys
2930 2935 2940

Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val
2945 2950 2955

Ser Ser Leu Thr His Leu Gly Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser
2960 2965 2970

Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg
2975 2980 2985

Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His
2990 2995 3000

Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys
3005 3010 3015

Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys
3020 3025 3030

Pro Asp Gly Ile His Asp Val Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro
3035 3040 3045

Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln
3050 3055 3060

Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr
3065 3070 3075

Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys
3080 3085 3090

Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu
3095 3100 3105

Glu Trp Thr Lys Arg Gln His Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala
3110 3115 3120

Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala
3125 3130 3135

Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp
3140 3145 3150

Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln
3155 3160 3165

Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp
3170 3175 3180

Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys
3185 3190 3195

Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met
3200 3205 3210

Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg
3215 3220 3225

Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro
3230 3235 3240

Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr
3245 3250 3255

Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr
3260 3265 3270

Arg Lys Ser Thr His Ala Glu Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser
3275 3280 3285

Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu
3290 3295 3300

Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg
3305 3310 3315

Ser Leu Ala His Leu Lys Arg Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly
3320 3325 3330

Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu
3335 3340 3345

Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile
3350 3355 3360

Pro His Lys Ile Pro Thr Ser Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met
3365 3370 3375

Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile
3380 3385 3390

Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe
3395 3400 3405

Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser
3410 3415 3420

Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys
3425 3430 3435

Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu
3440 3445 3450

Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr
3455 3460 3465

Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys
3470 3475 3480

Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro
3485 3490 3495

Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr
3500 3505 3510

Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg
3515 3520 3525

Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro
3530 3535 3540

Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly
3545 3550 3555

Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly
3560 3565 3570

Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile
3575 3580 3585

Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala
3590 3595 3600

Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys
3605 3610 3615

Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp
3620 3625 3630

Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala
3635 3640 3645

Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val
3650 3655 3660

Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn
3665 3670 3675

Tyr Val His Arg Ile Leu Asp Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys
3680 3685 3690

Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr
3695 3700 3705

Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu
3710 3715 3720

Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly
3725 3730 3735

Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile
3740 3745 3750

Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln
3755 3760 3765

Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
3770 3775 3780

Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu
3785 3790 3795

Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala
3800 3805 3810

Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile
3815 3820 3825

Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His
3830 3835 3840

Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile
3845 3850 3855

Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu
3860 3865 3870

Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala
3875 3880 3885

Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val
3890 3895 3900

Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu
3905 3910 3915

Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn
3920 3925 3930

Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn
3935 3940 3945

Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp
3950 3955 3960

Asn His Leu Lys Trp Ser Asn Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile
3965 3970 3975

Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu
3980 3985 3990

Met Leu Lys Ser Asp Leu His Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
3995 4000 4005

<210> 3
<211> 4007
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 3

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn

65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly

340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu

610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys
770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr

885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Gln His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys

1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg
1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu

1400 1405 1410

Phe Asp Lys Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly
1415 1420 1425

Val Asn Cys Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly
1430 1435 1440

Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser
1445 1450 1455

Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln
1460 1465 1470

Val Lys Met Pro Lys Ser His Lys Ala Ile Arg Ala Asp Gly Trp
1475 1480 1485

Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp
1490 1495 1500

Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro
1505 1510 1515

Ser Val Glu Gln Cys Asn Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly
1520 1525 1530

Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala
1535 1540 1545

Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His
1550 1555 1560

His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln
1565 1570 1575

Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His
1580 1585 1590

Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys
1595 1600 1605

Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
1610 1615 1620

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser
1625 1630 1635

Thr Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln
1640 1645 1650

Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe

1655 1660 1665

Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu
1670 1675 1680

Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val
1685 1690 1695

Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser
1700 1705 1710

Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile
1715 1720 1725

Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr
1730 1735 1740

Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu
1745 1750 1755

Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg
1760 1765 1770

Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp
1775 1780 1785

Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly
1790 1795 1800

Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile
1805 1810 1815

Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala
1820 1825 1830

Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu
1835 1840 1845

Pro Asp Asp Glu Ile Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
1850 1855 1860

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
1865 1870 1875

Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Val Leu
1880 1885 1890

Phe Leu Ile Leu Arg Met Glu Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu
1895 1900 1905

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

1910 1915 1920

Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn
1925 1930 1935

Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg
1940 1945 1950

Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn
1955 1960 1965

Trp Asp Gly Val Leu Glu Met Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro
1970 1975 1980

Ile Pro Thr Ser Gln Met His Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met
1985 1990 1995

Ser Asp Asn His Asp Ala Ser Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu
2000 2005 2010

Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe
2015 2020 2025

Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu
2030 2035 2040

Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys
2045 2050 2055

Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser
2060 2065 2070

Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val
2075 2080 2085

Arg Arg Ser Ser His Gly Thr Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Leu
2090 2095 2100

Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys
2105 2110 2115

Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys
2120 2125 2130

Asp Val Ile Ile Gly Arg Met Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys
2135 2140 2145

Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu
2150 2155 2160

Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn

2165 2170 2175

Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu
2180 2185 2190

Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln
2195 2200 2205

Phe Pro His Phe Glu Asn His Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly
2210 2215 2220

Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met
2225 2230 2235

Ser Val Lys Thr Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe
2240 2245 2250

Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu
2255 2260 2265

Lys Leu His Ser Gln Val Thr Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser
2270 2275 2280

Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe
2285 2290 2295

Gln Gln Phe Asn Asp His Lys Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu
2300 2305 2310

Leu Pro His Asp His Pro Phe Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr
2315 2320 2325

Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His
2330 2335 2340

Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp
2345 2350 2355

Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser
2360 2365 2370

Glu Val Leu Lys His Val Arg Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro
2375 2380 2385

Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn
2390 2395 2400

Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp
2405 2410 2415

Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys

2420 2425 2430

Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu
2435 2440 2445

Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro
2450 2455 2460

Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile
2465 2470 2475

Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr
2480 2485 2490

Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn
2495 2500 2505

Asn His Gln Arg Lys Leu Ser Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met
2510 2515 2520

Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu
2525 2530 2535

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu
2540 2545 2550

Met Arg Val His Asn Asn Thr Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg
2555 2560 2565

Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln
2570 2575 2580

Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala
2585 2590 2595

Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn
2600 2605 2610

Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val
2615 2620 2625

Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu
2630 2635 2640

Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu
2645 2650 2655

Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn
2660 2665 2670

Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu

2675 2680 2685

Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile
2690 2695 2700

Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu
2705 2710 2715

Thr Val Ala His Phe Ala Glu Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln
2720 2725 2730

Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His
2735 2740 2745

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile
2750 2755 2760

Pro Gly Leu His Ser Ser Thr Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu
2765 2770 2775

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe
2780 2785 2790

Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe
2795 2800 2805

Trp Arg Phe Ile His Val His Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu
2810 2815 2820

Met Ser Ala Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile
2825 2830 2835

Thr His Ile Asp Lys Leu Val Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile
2840 2845 2850

Ala Met Gly Met Ser Pro Ala Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys
2855 2860 2865

Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile
2870 2875 2880

Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg
2885 2890 2895

Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser
2900 2905 2910

Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile
2915 2920 2925

Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys

2930 2935 2940

Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val
2945 2950 2955

Ser Ser Leu Thr His Leu Gly Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser
2960 2965 2970

Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg
2975 2980 2985

Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His
2990 2995 3000

Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys
3005 3010 3015

Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys
3020 3025 3030

Pro Asp Gly Ile His Asp Val Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro
3035 3040 3045

Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln
3050 3055 3060

Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr
3065 3070 3075

Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys
3080 3085 3090

Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu
3095 3100 3105

Glu Trp Thr Lys Arg Gln His Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala
3110 3115 3120

Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala
3125 3130 3135

Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp
3140 3145 3150

Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln
3155 3160 3165

Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp
3170 3175 3180

Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys

3185 3190 3195

Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met
3200 3205 3210

Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg
3215 3220 3225

Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro
3230 3235 3240

Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr
3245 3250 3255

Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr
3260 3265 3270

Arg Lys Ser Thr His Ala Glu Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser
3275 3280 3285

Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu
3290 3295 3300

Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg
3305 3310 3315

Ser Leu Ala His Leu Lys Arg Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly
3320 3325 3330

Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu
3335 3340 3345

Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile
3350 3355 3360

Pro His Lys Ile Pro Thr Ser Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met
3365 3370 3375

Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile
3380 3385 3390

Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe
3395 3400 3405

Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser
3410 3415 3420

Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys
3425 3430 3435

Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu

3440 3445 3450

Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr
3455 3460 3465

Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys
3470 3475 3480

Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro
3485 3490 3495

Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr
3500 3505 3510

Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg
3515 3520 3525

Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro
3530 3535 3540

Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly
3545 3550 3555

Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly
3560 3565 3570

Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile
3575 3580 3585

Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala
3590 3595 3600

Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys
3605 3610 3615

Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp
3620 3625 3630

Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala
3635 3640 3645

Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val
3650 3655 3660

Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn
3665 3670 3675

Tyr Val His Arg Ile Leu Asp Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys
3680 3685 3690

Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr

3695 3700 3705

Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu
3710 3715 3720

Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly
3725 3730 3735

Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile
3740 3745 3750

Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln
3755 3760 3765

Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
3770 3775 3780

Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu
3785 3790 3795

Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala
3800 3805 3810

Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile
3815 3820 3825

Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His
3830 3835 3840

Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile
3845 3850 3855

Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu
3860 3865 3870

Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala
3875 3880 3885

Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val
3890 3895 3900

Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu
3905 3910 3915

Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn
3920 3925 3930

Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn
3935 3940 3945

Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp

3950 3955 3960

Asn His Leu Lys Trp Ser Asn Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile
3965 3970 3975

Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu
3980 3985 3990

Met Leu Lys Ser Asp Leu His Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
3995 4000 4005

<210> 4
<211> 15752
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 4

acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc 60

aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgatggg 120

aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg 180

caagcaggga gctagaacga ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct 240

gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat 300

cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca 360

ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa aagtaagaaa aaagcacagc 420

aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga 480

acatccaggg gcaaatggta catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa 540

aagtagtaga agagaaggct ttcggcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag 600

aaggagccac cccacaagat ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag 660

ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc agaatgggat agagtgcatc 720

cagtgcatgc agggcctatt gcaccaggcc agatgagaga accaagggga agtgacatag 780

caggaactac tagtaccctt caggaacaaa taggatggat gacaaataat ccacctatcc 840

cagtaggaga aatttataaa agatggataa tcctgggatc aaataaaata gtaagaatgt 900

atagccctac cagcattctg gacataagac aaggaccaaa agaacccttt agagactatg 960

tagaccggtt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc acaggaggta aaaaattgga 1020

tgacagaaac cttgttggtc caaaatgcga acccagattg taagactatt ttaaaagcat 1080

tgggaccagc ggctacacta gaagaaatga tgacagcatg tcagggagta ggaggacccg 1140

gccataaggc aagagttttg gctgaagcaa tgagccaagt aacaaattca gctaccataa 1200

tgatgcagag aggcaatttt aggaaccaaa gaaagattgt taagtgtttc aattgtggca 1260

aagaagggca cacagccaga aattgcaggg cccctaggaa aaagggctgt tggaaatgtg 1320

gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga 1380

tctggccttc ctacaaggga aggccaggga attttcttca gagcagacca gagccaacag 1440

ccccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactcccccc cagaagcagg 1500

agccgataga caaggaactg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcaacgacc 1560

cctcgtcaca ataatcgcta gcatattatg ctacatatga aaaaaactaa cagatatcat 1620

ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcggt 1680

aggagagata gatgagatcg aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca 1740

agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga 1800

cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc 1860

tgagcaagtt gaaggcttta tacaggggcc tttagatgac tatgcagatg aggaagtgga 1920

tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac 1980

cttacggttg acatcgccag agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac 2040

gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc 2100

atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac 2160

tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta tcagatgttt ggtctctctc 2220

aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt 2280

ggatgaattg ttctcatcta gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc 2340

tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt 2400

caaatattct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc 2460

aatccattca tcatgagttc cttaaagaag attctcggtc tgaaggggaa aggtaagaaa 2520

tctaagaaat tagggatcgc accacccccc tatgaagagg acactagcat ggagtatgct 2580

ccgagcgctc caattgacaa atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg 2640

aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt 2700

ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc 2760

ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt ttttgggttc ttctaatcta 2820

aaggccaatc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa 2880

ggcagggctt atttgacaca taggatgggg aagacccctc ccatgctcaa tgtaccagag 2940

cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc 3000

atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc 3060

aaatttttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc tgattgtcga gaaaaaggca 3120

tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc 3180

ttctgaacaa tccccggttt actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata 3240

tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca 3300

agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg 3360

aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc tctttacatc aatactacaa 3420

aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa 3480

tcatacatgt caacagctac ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata 3540

aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg 3600

accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca 3660

gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact tggcttatac agagtgggca 3720

gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa 3780

tgatcaatga acagtttgaa cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg 3840

gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca 3900

aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg 3960

ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg aatgtctaca gaagatgtaa 4020

cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc 4080

aagaaattga caaggccgat tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta 4140

agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc 4200

ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat 4260

ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg atcctctgcc gacttggcac 4320

aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga 4380

ctaatgcacc gccacaaggc agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa 4440

acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag 4500

gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata 4560

attctcagat cacctattat atattatgtt acatatgaaa aaaactaaca gagatcgatc 4620

tgtttacgcg tcactatgtt gtcttatcta atctttgcac ttgccgtttc gcccattttg 4680

ggcaaaattg aaattgtgtt tcctcaacat accactgggg attggaagag agttccccat 4740

gaatataatt attgccctac cagcgcagac aagaactcac atgggactca aacaggaatc 4800

cctgttgagt taacaatgcc aaaaggacta acaacccatc aagttgaagg atttatgtgt 4860

cactcagcct tgtggatgac cacttgtgac ttcagatggt atgggccaaa atacataacc 4920

cattccatac ataatgaaga gcctacagat tatcaatgtt tggaggccat taagtcatac 4980

aaagatggag tcagtttcaa tccagggttt cctcctcaga gctgcgggta tggcacagtt 5040

accgatgccg aagcccatat tgtgacagtt actccccact ctgtcaaagt ggacgagtac 5100

acgggggaat ggatcgatcc acatttcatc ggaggaaggt gcaaaggaca aatttgtgaa 5160

acagtccata attccacaaa atggtttacg tcctctgatg gagaaagtgt ctgcagtcaa 5220

ttgtttactt tggttggagg aatttttttc tctgattcag aagagattac ctccatgggg 5280

ttaccagaaa caggaatcag aagtaattac ttcccctaca tatctacaga gggaatttgc 5340

aaaatgccgt tttgcagaaa acaggggtac aagcttaaaa atgacctctg gttccagatc 5400

atggacccag acctggataa aacggttaga gatctccctc atattaagga ctgtgacctc 5460

tcctcgtcca taatcacacc aggagaacat gctacagaca tctcactgat atcagatgtt 5520

gaaaggatcc tagactatgc tctttgtcag aatacatgga gtaaaattga atcgggagaa 5580

ccaattactc cggtagatct cagctatctt gggccaaaaa acccaggggt tgggccggtc 5640

ttcaccatca ttaacggttc cctgcattat tttacatcga agtatctgcg agtcgaatta 5700

gaaagtcctg tcatacccag aatggaagga aaagttgcag gaactaggat tgtacggcaa 5760

ttgtgggatc agtggtttcc tttcggagaa gttgagattg gacccaatgg tgtgttgaaa 5820

acgaagcaag ggtataaatt cccactacac atcattggaa ctggagaagt agacagtgac 5880

atcaaaatgg aaagggttgt caagcactgg gaacaccccc atattgaggc cgctcagaca 5940

tttttaaaaa aagatgacac aggagaagtc ctttattatg gcgacaccgg agtgtcgaaa 6000

aatccagttg aattagtcga gggatggttt agtggatgga ggagctccct catgggagtg 6060

ctggttgtga ttataggatt tgtgatttta atgtttttaa ttcgataagc tagccgccta 6120

gccagattct tcatgtttgg accaaatcaa cttgtgatac catgctcaaa gaggcctcaa 6180

ttatatttga gtttttaatt tttatgaaaa aaactaacag caatcatgga agtccacgat 6240

tttgagaccg acgagttcaa tgatttcaat gaagatgact atgccacaag agaattcctg 6300

aatcccgatg agcgcatgac gtacttgaat catgctgatt acaacctgaa ttctcctcta 6360

attagtgatg atattgacaa tttaatcagg aaattcaatt ctcttccaat tccctcgatg 6420

tgggatagta agaactggga tggagttctt gagatgttaa cgtcatgtca agccaatccc 6480

atcccaacat ctcagatgca taaatggatg ggaagttggt taatgtctga taatcatgat 6540

gccagtcaag ggtatagttt tttacatgaa gtggacaaag aggcagaaat aacatttgac 6600

gtggtggaga ccttcatccg cggctggggc aacaaaccaa ttgaatacat caaaaaggaa 6660

agatggactg actcattcaa aattctcgct tatttgtgtc aaaagttttt ggacttacac 6720

aagttgacat taatcttaaa tgctgtctct gaggtggaat tgctcaactt ggcgaggact 6780

ttcaaaggca aagtcagaag aagttctcat ggaacgaaca tatgcaggat tagggttccc 6840

agcttgggtc ctacttttat ttcagaagga tgggcttact tcgagaaact tgatattcta 6900

atggaccgaa actttctgtt aatggtcaaa gatgtgatta tagggaggat gcaaacggtg 6960

ctatccatgg tatgtagaat agacaacctg ttctcagagc aagacatctt ctcccttcta 7020

aatatctaca gaattggaga taaaattgtg gagaggcagg gaaatttttc ttatgacttg 7080

attaaaatgg tggaaccgat atgcaacttg aagctgatga aattagcaag agaatcaagg 7140

cctttagtcc cacaattccc tcattttgaa aatcatatca agacttctgt tgatgaaggg 7200

gcaaaaattg accgaggtat aagattcctc catgatcaga taatgagtgt gaaaacagtg 7260

gatctcacac tggtgattta tggatcgttc agacattggg gtcatccttt tatagattat 7320

tacactggac tagaaaaatt acattcccaa gtaaccatga agaaagatat tgatgtgtca 7380

tatgcaaaag cacttgcaag tgatttagct cggattgttc tatttcaaca gttcaatgat 7440

cataaaaagt ggttcgtgaa tggagacttg ctccctcatg atcatccctt taaaagtcat 7500

gttaaagaaa atacatggcc cacagctgct caagttcaag attttggaga taaatggcat 7560

gaacttccgc tgattaaatg ttttgaaata cccgacttac tagacccatc gataatatac 7620

tctgacaaaa gtcattcaat gaataggtca gaggtgttga aacatgtccg aatgaatccg 7680

aacactccta tccctagtaa aaaggtgttg cagactatgt tggacacaaa ggctaccaat 7740

tggaaagaat ttcttaaaga gattgatgag aagggcttag atgatgatga tctaattatt 7800

ggtcttaaag gaaaggagag ggaactgaag ttggcaggta gatttttctc cctaatgtct 7860

tggaaattgc gagaatactt tgtaattacc gaatatttga taaagactca tttcgtccct 7920

atgtttaaag gcctgacaat ggcggacgat ctaactgcag tcattaaaaa gatgttagat 7980

tcctcatccg gccaaggatt gaagtcatat gaggcaattt gcatagccaa tcacattgat 8040

tacgaaaaat ggaataacca ccaaaggaag ttatcaaacg gcccagtgtt ccgagttatg 8100

ggccagttct taggttatcc atccttaatc gagagaactc atgaattttt tgagaaaagt 8160

cttatatact acaatggaag accagacttg atgcgtgttc acaacaacac actgatcaat 8220

tcaacctccc aacgagtttg ttggcaagga caagagggtg gactggaagg tctacggcaa 8280

aaaggatgga gtatcctcaa tctactggtt attcaaagag aggctaaaat cagaaacact 8340

gctgtcaaag tcttggcaca aggtgataat caagttattt gcacacagta taaaacgaag 8400

aaatcgagaa acgttgtaga attacagggt gctctcaatc aaatggtttc taataatgag 8460

aaaattatga ctgcaatcaa aatagggaca gggaagttag gacttttgat aaatgacgat 8520

gagactatgc aatctgcaga ttacttgaat tatggaaaaa taccgatttt ccgtggagtg 8580

attagagggt tagagaccaa gagatggtca cgagtgactt gtgtcaccaa tgaccaaata 8640

cccacttgtg ctaatataat gagctcagtt tccacaaatg ctctcaccgt agctcatttt 8700

gctgagaacc caatcaatgc catgatacag tacaattatt ttgggacatt tgctagactc 8760

ttgttgatga tgcatgatcc tgctcttcgt caatcattgt atgaagttca agataagata 8820

ccgggcttgc acagttctac tttcaaatac gccatgttgt atttggaccc ttccattgga 8880

ggagtgtcgg gcatgtcttt gtccaggttt ttgattagag ccttcccaga tcccgtaaca 8940

gaaagtctct cattctggag attcatccat gtacatgctc gaagtgagca tctgaaggag 9000

atgagtgcag tatttggaaa ccccgagata gccaagtttc gaataactca catagacaag 9060

ctagtagaag atccaacctc tctgaacatc gctatgggaa tgagtccagc gaacttgtta 9120

aagactgagg ttaaaaaatg cttaatcgaa tcaagacaaa ccatcaggaa ccaggtgatt 9180

aaggatgcaa ccatatattt gtatcatgaa gaggatcggc tcagaagttt cttatggtca 9240

ataaatcctc tgttccctag atttttaagt gaattcaaat caggcacttt tttgggagtc 9300

gcagacgggc tcatcagtct atttcaaaat tctcgtacta ttcggaactc ctttaagaaa 9360

aagtatcata gggaattgga tgatttgatt gtgaggagtg aggtatcctc tttgacacat 9420

ttagggaaac ttcatttgag aaggggatca tgtaaaatgt ggacatgttc agctactcat 9480

gctgacacat taagatacaa atcctggggc cgtacagtta ttgggacaac tgtaccccat 9540

ccattagaaa tgttgggtcc acaacatcga aaagagactc cttgtgcacc atgtaacaca 9600

tcagggttca attatgtttc tgtgcattgt ccagacggga tccatgacgt ctttagttca 9660

cggggaccat tgcctgctta tctagggtct aaaacatctg aatctacatc tattttgcag 9720

ccttgggaaa gggaaagcaa agtcccactg attaaaagag ctacacgtct tagagatgct 9780

atctcttggt ttgttgaacc cgactctaaa ctagcaatga ctatactttc taacatccac 9840

tctttaacag gcgaagaatg gaccaaaagg cagcatgggt tcaaaagaac agggtctgcc 9900

cttcataggt tttcgacatc tcggatgagc catggtgggt tcgcatctca gagcactgca 9960

gcattgacca ggttgatggc aactacagac accatgaggg atctgggaga tcagaatttc 10020

gacttttttat tccaagcaac gttgctctat gctcaaatta ccaccactgt tgcaagagac 10080

ggatggatca ccagttgtac agatcattat catattgcct gtaagtcctg tttgagaccc 10140

atagaagaga tcaccctgga ctcaagtatg gactacacgc ccccagatgt atcccatgtg 10200

ctgaagacat ggaggaatgg ggaaggttcg tggggacaag agataaaaca gatctatcct 10260

ttagaaggga attggaagaa tttagcacct gctgagcaat cctatcaagt cggcagatgt 10320

ataggttttc tatatggaga cttggcgtat agaaaatcta ctcatgccga ggacagttct 10380

ctatttcctc tatctataca aggtcgtatt agaggtcgag gtttcttaaa agggttgcta 10440

gacggattaa tgagagcaag ttgctgccaa gtaatacacc ggagaagtct ggctcatttg 10500

aagaggccgg ccaacgcagt gtacggaggt ttgatttact tgattgataa attgagtgta 10560

tcacctccat tcatttctct tactagatca ggacctatta gagacgaatt agaaacgatt 10620

ccccacaaga tcccaacctc ctatccgaca agcaaccgtg atatgggggt gattgtcaga 10680

aattacttca aataccaatg ccgtctaatt gaaaagggaa aatacagatc acattattca 10740

caattatggt tattctcaga tgtcttatcc atagacttca ttggaccatt ctctatttcc 10800

accaccctct tgcaaatcct atacaagcca tttttatctg ggaaagataa gaatgagttg 10860

agagagctgg caaatctttc ttcattgcta agatcaggag aggggtggga agacatacat 10920

gtgaaattct tcaccaagga catattattg tgtccagagg aaatcagaca tgcttgcaag 10980

ttcgggattg ctaaggataa taataaagac atgagctatc ccccttgggg aagggaatcc 11040

agagggacaa ttacaacaat ccctgtttat tatacgacca ccccttaccc aaagatgcta 11100

gagatgcctc caagaatcca aaatcccctg ctgtccggaa tcaggttggg ccaattacca 11160

actggcgctc attataaaat tcggagtata ttacatggaa tgggaatcca ttacagggac 11220

ttcttgagtt gtggagacgg ctccggaggg atgactgctg cattactacg agaaaatgtg 11280

catagcagag gaatattcaa tagtctgtta gaattatcag ggtcagtcat gcgaggcgcc 11340

tctcctgagc cccccagtgc cctagaaact ttaggaggag ataaatcgag atgtgtaaat 11400

ggtgaaacat gttgggaata tccatctgac ttatgtgacc caaggacttg ggactatttc 11460

ctccgactca aagcaggctt ggggcttcaa attgatttaa ttgtaatgga tatggaagtt 11520

cgggattctt ctactagcct gaaaattgag acgaatgtta gaaattatgt gcaccggatt 11580

ttggatgagc aaggagtttt aatctacaag acttatggaa catatatttg tgagagcgaa 11640

aagaatgcag taacaatcct tggtcccatg ttcaagacgg tcgacttagt tcaaacagaa 11700

tttagtagtt ctcaaacgtc tgaagtatat atggtatgta aaggtttgaa gaaattaatc 11760

gatgaaccca atcccgattg gtcttccatc aatgaatcct ggaaaaacct gtacgcattc 11820

cagtcatcag aacaggaatt tgccagagca aagaaggtta gtacatactt taccttgaca 11880

ggtattccct cccaattcat tcctgatcct tttgtaaaca ttgagactat gctacaaata 11940

ttcggagtac ccacgggtgt gtctcatgcg gctgccttaa aatcatctga tagacctgca 12000

gatttattga ccattagcct tttttatatg gcgattatat cgtattataa catcaatcat 12060

atcagagtag gaccgatacc tccgaacccc ccatcagatg gaattgcaca aaatgtgggg 12120

atcgctataa ctggtataag cttttggctg agtttgatgg agaaagacat tccactatat 12180

caacagtgtt tagcagttat ccagcaatca ttcccgatta ggtgggaggc tgtttcagta 12240

aaaggaggat acaagcagaa gtggagtact agaggtgatg ggctcccaaa agatacccga 12300

atttcagact ccttggcccc aatcgggaac tggatcagat ctctggaatt ggtccgaaac 12360

caagttcgtc taaatccatt caatgagatc ttgttcaatc agctatgtcg tacagtggat 12420

aatcatttga aatggtcaaa tttgcgaaga aacacaggaa tgattgaatg gatcaataga 12480

cgaatttcaa aagaagaccg gtctatactg atgttgaaga gtgacctaca cgaggaaaac 12540

tcttggagag attaaaaaat catgaggaga ctccaaactt taagtatgaa aaaaactttg 12600

atccttaaga ccctcttgtg gtttttattt tttatctggt tttgtggtct tcgtgggtcg 12660

gcatggcatc tccacctcct cgcggtccga cctgggcatc cgaaggagga cgtcgtccac 12720

tcggatggct aagggagggg cccccgcggg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag 12780

ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc 12840

ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact atatccggat cgagacctcg atactagtgc 12900

ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat 12960

ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 13020

ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg 13080

cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 13140

tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca 13200

ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg 13260

taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 13320

agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 13380

cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 13440

tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc 13500

tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata 13560

gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 13620

acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 13680

acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 13740

cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta 13800

gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 13860

gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 13920

agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 13980

ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 14040

ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 14100

atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 14160

tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 14220

gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg 14280

ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg 14340

caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt 14400

cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct 14460

cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 14520

cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 14580

agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 14640

tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 14700

agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 14760

atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 14820

ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt 14880

cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 14940

caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 15000

attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 15060

agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctaaattgt 15120

aagcgttaat attttgttaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa 15180

ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 15240

gagtgttgtt ccagtttgga acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa 15300

agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag 15360

ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt 15420

tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg 15480

agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc 15540

cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgtc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 15600

ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc 15660

tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac 15720

ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gg 15752

<210> 5
<211> 4015
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 5

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr

225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys

500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys

770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr
885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu

1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys
1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg

1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu
1400 1405 1410

Phe Asp Lys Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser
1415 1420 1425

Pro Ile Leu Gly Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr
1430 1435 1440

Gly Asp Trp Lys Arg Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr
1445 1450 1455

Ser Ala Asp Lys Asn Ser His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val
1460 1465 1470

Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly
1475 1480 1485

Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg
1490 1495 1500

Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Glu Glu
1505 1510 1515

Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Asp
1520 1525 1530

Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr
1535 1540 1545

Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr Val Thr Pro

1550 1555 1560

His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile Asp Pro
1565 1570 1575

His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr Val
1580 1585 1590

His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
1595 1600 1605

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp
1610 1615 1620

Ser Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg
1625 1630 1635

Ser Asn Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met
1640 1645 1650

Pro Phe Cys Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp
1655 1660 1665

Phe Gln Ile Met Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu
1670 1675 1680

Pro His Ile Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro
1685 1690 1695

Gly Glu His Ala Thr Asp Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg
1700 1705 1710

Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu
1715 1720 1725

Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro
1730 1735 1740

Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe Thr Ile Ile Asn Gly Ser
1745 1750 1755

Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser
1760 1765 1770

Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala Gly Thr Arg Ile
1775 1780 1785

Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly Glu Val Glu
1790 1795 1800

Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr Lys Phe

1805 1810 1815

Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile Lys
1820 1825 1830

Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
1835 1840 1845

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr
1850 1855 1860

Tyr Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu
1865 1870 1875

Gly Trp Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Ala
1880 1885 1890

Val Ile Ile Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Arg Met Glu
1895 1900 1905

Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu Phe Asn Asp Phe Asn Glu Asp
1910 1915 1920

Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr
1925 1930 1935

Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser
1940 1945 1950

Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile
1955 1960 1965

Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn Trp Asp Gly Val Leu Glu Met
1970 1975 1980

Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro Ile Pro Thr Ser Gln Met His
1985 1990 1995

Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met Ser Asp Asn His Asp Ala Ser
2000 2005 2010

Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile
2015 2020 2025

Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys
2030 2035 2040

Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys
2045 2050 2055

Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys Phe Leu Asp Leu His Lys Leu

2060 2065 2070

Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu
2075 2080 2085

Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val Arg Arg Ser Ser His Gly Thr
2090 2095 2100

Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile
2105 2110 2115

Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp
2120 2125 2130

Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys Asp Val Ile Ile Gly Arg Met
2135 2140 2145

Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser
2150 2155 2160

Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp
2165 2170 2175

Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys
2180 2185 2190

Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg
2195 2200 2205

Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln Phe Pro His Phe Glu Asn His
2210 2215 2220

Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile
2225 2230 2235

Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met Ser Val Lys Thr Val Asp Leu
2240 2245 2250

Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe
2255 2260 2265

Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu Lys Leu His Ser Gln Val Thr
2270 2275 2280

Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser
2285 2290 2295

Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe Gln Gln Phe Asn Asp His Lys
2300 2305 2310

Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu Leu Pro His Asp His Pro Phe

2315 2320 2325

Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val
2330 2335 2340

Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys
2345 2350 2355

Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp
2360 2365 2370

Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Lys His Val Arg
2375 2380 2385

Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr
2390 2395 2400

Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu
2405 2410 2415

Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu
2420 2425 2430

Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser
2435 2440 2445

Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr
2450 2455 2460

Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro Met Phe Lys Gly Leu Thr Met
2465 2470 2475

Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser
2480 2485 2490

Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn
2495 2500 2505

His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Leu Ser
2510 2515 2520

Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro
2525 2530 2535

Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile
2540 2545 2550

Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu Met Arg Val His Asn Asn Thr
2555 2560 2565

Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu

2570 2575 2580

Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn
2585 2590 2595

Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val
2600 2605 2610

Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr
2615 2620 2625

Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu
2630 2635 2640

Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys
2645 2650 2655

Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr
2660 2665 2670

Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe
2675 2680 2685

Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val
2690 2695 2700

Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met
2705 2710 2715

Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Glu
2720 2725 2730

Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe
2735 2740 2745

Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser
2750 2755 2760

Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile Pro Gly Leu His Ser Ser Thr
2765 2770 2775

Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val
2780 2785 2790

Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp
2795 2800 2805

Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe Trp Arg Phe Ile His Val His
2810 2815 2820

Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu Met Ser Ala Val Phe Gly Asn

2825 2830 2835

Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile Thr His Ile Asp Lys Leu Val
2840 2845 2850

Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ala Met Gly Met Ser Pro Ala
2855 2860 2865

Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg
2870 2875 2880

Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu
2885 2890 2895

Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn
2900 2905 2910

Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe
2915 2920 2925

Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg
2930 2935 2940

Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp
2945 2950 2955

Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val Ser Ser Leu Thr His Leu Gly
2960 2965 2970

Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser
2975 2980 2985

Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr
2990 2995 3000

Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro
3005 3010 3015

Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly
3020 3025 3030

Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys Pro Asp Gly Ile His Asp Val
3035 3040 3045

Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr
3050 3055 3060

Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys
3065 3070 3075

Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser

3080 3085 3090

Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser
3095 3100 3105

Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu Glu Trp Thr Lys Arg Gln His
3110 3115 3120

Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser
3125 3130 3135

Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu
3140 3145 3150

Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp
3155 3160 3165

Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln
3170 3175 3180

Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr
3185 3190 3195

Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu
3200 3205 3210

Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val
3215 3220 3225

Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly
3230 3235 3240

Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn
3245 3250 3255

Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly
3260 3265 3270

Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Thr His Ala Glu
3275 3280 3285

Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly
3290 3295 3300

Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser
3305 3310 3315

Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Leu Ala His Leu Lys Arg
3320 3325 3330

Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys

3335 3340 3345

Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro
3350 3355 3360

Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile Pro His Lys Ile Pro Thr Ser
3365 3370 3375

Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr
3380 3385 3390

Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser
3395 3400 3405

His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp
3410 3415 3420

Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu
3425 3430 3435

Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu
3440 3445 3450

Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu
3455 3460 3465

Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro
3470 3475 3480

Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn
3485 3490 3495

Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly
3500 3505 3510

Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro
3515 3520 3525

Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser
3530 3535 3540

Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile
3545 3550 3555

Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu
3560 3565 3570

Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg
3575 3580 3585

Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu

3590 3595 3600

Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala
3605 3610 3615

Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu
3620 3625 3630

Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp
3635 3640 3645

Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp
3650 3655 3660

Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu
3665 3670 3675

Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn Tyr Val His Arg Ile Leu Asp
3680 3685 3690

Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys
3695 3700 3705

Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys
3710 3715 3720

Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser
3725 3730 3735

Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu
3740 3745 3750

Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu
3755 3760 3765

Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys
3770 3775 3780

Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile
3785 3790 3795

Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly
3800 3805 3810

Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp
3815 3820 3825

Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile
3830 3835 3840

Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro

3845 3850 3855

Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala
3860 3865 3870

Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile
3875 3880 3885

Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro
3890 3895 3900

Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys
3905 3910 3915

Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser
3920 3925 3930

Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu
3935 3940 3945

Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe
3950 3955 3960

Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp Asn His Leu Lys Trp Ser Asn
3965 3970 3975

Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile
3980 3985 3990

Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu Met Leu Lys Ser Asp Leu His
3995 4000 4005

Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
4010 4015

<210> 6
<211> 4015
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 6

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

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

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

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

Sequence Listing

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Gly Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ser Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys
770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Asn Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr
885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Thr His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Sequence Listing

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys
1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg
1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu
1400 1405 1410

Phe Asp Lys Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser
1415 1420 1425

Pro Ile Leu Gly Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr
1430 1435 1440

Gly Asp Trp Lys Arg Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr
1445 1450 1455

Ser Ala Asp Lys Asn Ser His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val
1460 1465 1470

Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly
1475 1480 1485

Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg
1490 1495 1500

Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Glu Glu
1505 1510 1515

Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Asp
1520 1525 1530

Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr
1535 1540 1545

Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr Val Thr Pro
1550 1555 1560

His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile Asp Pro
1565 1570 1575

His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr Val
1580 1585 1590

His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
1595 1600 1605

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp
1610 1615 1620

Ser Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg
1625 1630 1635

Ser Asn Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met
1640 1645 1650

Pro Phe Cys Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp
1655 1660 1665

Phe Gln Ile Met Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu
1670 1675 1680

Pro His Ile Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro
1685 1690 1695

Gly Glu His Ala Thr Asp Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg
1700 1705 1710

Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu
1715 1720 1725

Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro
1730 1735 1740

Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe Thr Ile Ile Asn Gly Ser
1745 1750 1755

Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser
1760 1765 1770

Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala Gly Thr Arg Ile
1775 1780 1785

Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly Glu Val Glu
1790 1795 1800

Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr Lys Phe
1805 1810 1815

Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile Lys
1820 1825 1830

Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
1835 1840 1845

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr
1850 1855 1860

Tyr Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu
1865 1870 1875

Gly Trp Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Val
1880 1885 1890

Val Ile Ile Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Arg Met Glu
1895 1900 1905

Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu Phe Asn Asp Phe Asn Glu Asp
1910 1915 1920

Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr
1925 1930 1935

Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser
1940 1945 1950

Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile
1955 1960 1965

Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn Trp Asp Gly Val Leu Glu Met
1970 1975 1980

Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro Ile Pro Thr Ser Gln Met His
1985 1990 1995

Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met Ser Asp Asn His Asp Ala Ser
2000 2005 2010

Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile
2015 2020 2025

Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys
2030 2035 2040

Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys
2045 2050 2055

Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys Phe Leu Asp Leu His Lys Leu
2060 2065 2070

Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu
2075 2080 2085

Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val Arg Arg Ser Ser His Gly Thr
2090 2095 2100

Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile
2105 2110 2115

Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Glu Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp
2120 2125 2130

Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys Asp Val Ile Ile Gly Arg Met
2135 2140 2145

Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser
2150 2155 2160

Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp
2165 2170 2175

Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys
2180 2185 2190

Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg
2195 2200 2205

Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln Phe Pro His Phe Glu Asn His
2210 2215 2220

Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile
2225 2230 2235

Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met Ser Val Lys Thr Val Asp Leu
2240 2245 2250

Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe
2255 2260 2265

Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu Lys Leu His Ser Gln Val Thr
2270 2275 2280

Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser
2285 2290 2295

Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe Gln Gln Phe Asn Asp His Lys
2300 2305 2310

Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu Leu Pro His Asp His Pro Phe
2315 2320 2325

Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val
2330 2335 2340

Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys
2345 2350 2355

Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp
2360 2365 2370

Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Lys His Val Arg
2375 2380 2385

Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr
2390 2395 2400

Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu
2405 2410 2415

Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu
2420 2425 2430

Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser
2435 2440 2445

Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr
2450 2455 2460

Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro Met Phe Lys Gly Leu Thr Met
2465 2470 2475

Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser
2480 2485 2490

Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn
2495 2500 2505

His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Leu Ser
2510 2515 2520

Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro
2525 2530 2535

Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile
2540 2545 2550

Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu Met Arg Val His Asn Asn Thr
2555 2560 2565

Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu
2570 2575 2580

Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn
2585 2590 2595

Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val
2600 2605 2610

Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr
2615 2620 2625

Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu
2630 2635 2640

Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys
2645 2650 2655

Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr
2660 2665 2670

Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe
2675 2680 2685

Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val
2690 2695 2700

Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met
2705 2710 2715

Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Glu
2720 2725 2730

Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe
2735 2740 2745

Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser
2750 2755 2760

Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile Pro Gly Leu His Ser Ser Thr
2765 2770 2775

Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val
2780 2785 2790

Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp
2795 2800 2805

Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe Trp Arg Phe Ile His Val His
2810 2815 2820

Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu Met Ser Ala Val Phe Gly Asn
2825 2830 2835

Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile Thr His Ile Asp Lys Leu Val
2840 2845 2850

Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ala Met Gly Met Ser Pro Ala
2855 2860 2865

Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg
2870 2875 2880

Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu
2885 2890 2895

Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn
2900 2905 2910

Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe
2915 2920 2925

Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg
2930 2935 2940

Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp
2945 2950 2955

Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val Ser Ser Leu Thr His Leu Gly
2960 2965 2970

Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser
2975 2980 2985

Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr
2990 2995 3000

Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro
3005 3010 3015

Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly
3020 3025 3030

Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys Pro Asp Gly Ile His Asp Val
3035 3040 3045

Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr
3050 3055 3060

Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys
3065 3070 3075

Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser
3080 3085 3090

Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser
3095 3100 3105

Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu Glu Trp Thr Lys Arg Gln His
3110 3115 3120

Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser
3125 3130 3135

Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu
3140 3145 3150

Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp
3155 3160 3165

Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln
3170 3175 3180

Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr
3185 3190 3195

Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu
3200 3205 3210

Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val
3215 3220 3225

Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly
3230 3235 3240

Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn
3245 3250 3255

Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly
3260 3265 3270

Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Thr His Ala Glu
3275 3280 3285

Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly
3290 3295 3300

Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser
3305 3310 3315

Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Leu Ala His Leu Lys Arg
3320 3325 3330

Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys
3335 3340 3345

Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Ile Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro
3350 3355 3360

Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile Pro His Lys Ile Pro Thr Ser
3365 3370 3375

Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr
3380 3385 3390

Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser
3395 3400 3405

His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp
3410 3415 3420

Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu
3425 3430 3435

Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu
3440 3445 3450

Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu
3455 3460 3465

Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro
3470 3475 3480

Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn
3485 3490 3495

Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly
3500 3505 3510

Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro
3515 3520 3525

Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser
3530 3535 3540

Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile
3545 3550 3555

Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu
3560 3565 3570

Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg
3575 3580 3585

Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu
3590 3595 3600

Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala
3605 3610 3615

Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu
3620 3625 3630

Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp
3635 3640 3645

Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp
3650 3655 3660

Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu
3665 3670 3675

Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn Tyr Val His Arg Ile Leu Asp
3680 3685 3690

Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys
3695 3700 3705

Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys
3710 3715 3720

Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser
3725 3730 3735

Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu
3740 3745 3750

Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu
3755 3760 3765

Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys
3770 3775 3780

Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile
3785 3790 3795

Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly
3800 3805 3810

Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp
3815 3820 3825

Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile
3830 3835 3840

Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro
3845 3850 3855

Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala
3860 3865 3870

Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile
3875 3880 3885

Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro
3890 3895 3900

Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys
3905 3910 3915

Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser
3920 3925 3930

Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu
3935 3940 3945

Sequence Listing

```
Val Arg  Asn Gln Val Arg Leu  Asn Pro Phe Asn Glu  Ile Leu Phe
    3950                 3955                 3960

Asn Gln  Leu Cys Arg Thr Val  Asp Asn His Leu Lys  Trp Ser Asn
    3965                 3970                 3975

Leu Arg  Arg Asn Thr Gly Met  Ile Glu Trp Ile Asn  Arg Arg Ile
    3980                 3985                 3990

Ser Lys  Glu Asp Arg Ser Ile  Leu Met Leu Lys Ser  Asp Leu His
    3995                 4000                 4005

Glu Glu  Asn Ser Trp Arg Asp
    4010                 4015
```

236

VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR ATENUADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE, COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO

CLÁUSULA DE APOYO GUBERNAMENTAL

La investigación que condujo a la presente invención fue apoyada, por lo menos en parte, por el contrato número N01-A1-25458 de los institutos nacionales de salud. De acuerdo con esto, el gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona de manera general con virus ARN de cadena negativa. En particular, la invención se relaciona con métodos y composiciones para adaptar partículas del virus de la estomatitis vesicular (VSV) a crecimiento en cultivo de célula para uso en producción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un virus prototípico de la familia Rhabdoviridae, que pertenece al orden Mononegavíricos, que incluye virus de ARN con codificación negativa no segmentados de cadena única con un orden genético altamente conservado. El genoma de VSV de 11 kb contiene cinco genes que codifican cinco proteínas víricas: la proteína de nucleocpsido (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la glucoproteína de unión (G), y la ARN polimerasa dependiente ARN (L). El orden genético en el genoma es 3'-N-P-M-G-L-5' y numerosos estudios han demostrado que la expresión del gen es obligatoriamente secuencial desde el promotor único 3' (Rose y Whitt, Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication. *In "Fields Virology"*, 4th Edition, Vol.1. Lippincott and Williams and Wilkins, 1221-1244, 2001).

El gen N codifica la proteína de nucleocápsido responsable por encapsidar el genoma mientras que las secuencias codificantes P (fosfoproteína) y L (larga) especifican subunidades de la ARN polimerasa dependientes de ARN. La proteína de matriz (M) promueve la maduración del virión y alinea la superficie interior de la partícula del virus. El VSV codifica una glucoproteína de envoltura única (G) que sirve

como una proteína de unión de célula, media la función de membrana, y es el objetivo de anticuerpos neutralizantes.

Los dos serotipos más comunes de VSV en el hemisferio occidental se definen como Indiana (VSVin) y New Jersey (VSVnj). En la naturaleza, el VSV infecta el ganado originando una enfermedad autolimitante. Aunque las infecciones humanas de ocurrencia natural con VSV son poco frecuentes, se han reportado casos de infecciones de VSV para individuos directamente expuestos a ganado infectado o dentro de ambientes de laboratorio. La infección VSV de humanos es típicamente asintomática o resulta en una enfermedad similar a influenza leve (Fields, B.N., and K. Hawkins, N. Engl.J.Med. 277:989-94, 1967).Entre los mamíferos pequeños, los ratones se pueden infectar fácilmente de manera experimental por vía de una variedad de rutas de inoculación y sirve así como un modelo de animal pequeño excelente para estudios de inmunogenia, patogenia y neurovirulencia (Bruno-Lobo, et al. An. Microbiol. (Rio J.) 15:53-68, 1968; Bruno-Lobo, et al., An. Microbiol. (Rio J.) 15:69-80, 1968; Flanagan, E.B.et al. J.Virol. 77:5740-8, 2003; Wagner, R.R.Infect. Immun. 10:309-315, 1974; Huneycutt, et al. J. Virol. 67:6698-706, 1993).

En los pasados pocos años el VSV ha demostrado ser una promesa como un vector para las composiciones inmunogénicas que contienen un número de patógenos humanos que incluyen VIH, el virus de papiloma, RSV, el virus de la hepatitis C y el virus de la influenza. Numerosas propiedades hacen del VSV un vector candidato atractivo para el uso humano (Bukreyev, et al. J. Virol. 80:10293-306, 2006; Clarke, et al. Springer Semin Immunopathol. 28: 239-253, 2006). Estas propiedades incluyen: 1) el VSV no es un patógeno humano; 2) existe poca inmunidad preexistente que pudiera impedir su uso en humanos; 3) el VSV infecta fácilmente muchos tipos de célula; 4) este se propaga eficientemente en líneas celulares adecuadas para la elaboración de composiciones inmunogénicas; 5) este es genéticamente estable; 6) existen métodos mediante los cuales se pueden producir virus recombinantes; 7) el VSV puede aceptar uno o más insertos de gen externo y dirigir altos niveles de expresión luego de la infección y 8) la infección VSV es un inductor eficiente tanto de inmunidad celular como humoral. Tales estudios se han facilitado de manera notoria por el advenimiento de una técnica de genética inversa que permite la fácil recuperación del rVSV del cADN genómico (Lawson, et al. Proc Natl Acad Sci USA 92:4477-81, 1995; Schnell, et al. EMBO J 13: 4195-203, 1994). Además, la organización relativamente pequeña y el genoma simple del VSV

han probado ser sensibles a la infección del gen externo, con los virus resultantes que producen altos niveles de proteína externa. Los primeros vectores se designaron con una secuencia codificante externa insertada entre los genes G y L junto con los elementos de control transcripcional intergénicos de requisito. Se encontró que estos vectores prototipo provocan respuestas inmunes potentes contra el antígeno externo y son bien tolerados en los modelos animales en los cuales ellos fueron probados (Grigera, et al. Virus Res 69: 3-15, 2000; Kahn et al. J Virol 75: 11079-87, 2001; Roberts et al. J Virol 73: 3723-32, 1999; Roberts, et al. J Virol 72: 4704-11, 1998, Rose, et al. Cell 106:539-49, 2001; Rose, et al. J. Virol 74:10903-10, 2000; Schlereth, et al. J Virol 74:4652-7, 2000). Notablemente Rose et al, encontraron que la coadministración de dos vectores, uno que codifica VIH-1 env y el otro que codifica SIV gag, produjeron respuestas inmunes en macacos inmunizados que protegen contra la exposición a SVIH patógeno (Rose, et al. Cell 106:539-49, 2001). La mayoría de estos estudios se condujeron con vectores VSV prototípicos que se derivaron de una estructura VSV tipo intacta (wt) y mostró que estaba significativamente atenuada comparado con los VSV wt (Roberts, et al. J. Virol. 72:4704-11, 1998). Estudios más recientes mostraron que los vectores VSV prototipo, cuando se evalúan en el modelo de primate no humano para neurovirulencia, originaron un nivel significativo de daño a los tejidos neurológicos, aunque a niveles reducidos comparados con el virus tipo intacto (Jonson, et al. Virol. 360, 36-49, 2007). Estas observaciones condujeron a la conclusión de que el vector rVSV prototipo podría no atenuarse adecuadamente para uso en humanos.

El desarrollo de métodos de propagación escalables que cumplen con las reglamentaciones que rigen la fabricación de las composiciones inmunogénicas para la administración a humanos permanecen como un obstáculo que debe ser superado antes de que la evaluación clínica se pueda justificar. Cuando se diseña un vector para la administración a humanos, es imperativo que las mutaciones que resulten en la atenuación vírica sean estables y que los rendimientos de los virus sean suficientes para producción a escala. Una dosis humana única se espera que sea de por lo menos 1 x 10^7 IU, así, la elaboración de un vector será práctica solamente si más de 10^7 IU se producen por ml de medio de cultivo.

Subsiste la necesidad en una técnica de métodos para adaptar las partículas VSV atenuadas para el aumento del crecimiento en cultivo de células, en donde los rendimientos de las partículas VSV atenuadas recuperadas son suficientes para ser

239

utilizadas en elaboración a gran escala. De manera deseable, tales métodos emplearían células cualificadas para producción comercial. Además, tales métodos deben retener las mutaciones originales que resulten en la atenuación vírica, mientras que al mismo tiempo mejoran los rendimientos de niveles suficientes para producción a escala.

La cita de cualquier referencia aquí no debe ser considerada como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior para la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la presente invención, se suministra un proceso o un método para la adaptación de un VSV altamente atenuado recombinante a las condiciones del cultivo de tejido al pasar de manera continua a baja multiplicidad de la infección (MOI) en células Vero o en cualquier sustrato de células susceptibles. El proceso de paso en serie múltiple da como resultado cambios genotípicos caracterizados por el acrecentamiento progresivo de un número de sustituciones de nucleótido (NT) a través del genoma vírico. La mayoría de estas sustituciones de nucleótido da como resultado sustituciones de aminoácido (AA) en las proteínas VSV. Este proceso resulto en la adaptación fenotípica del virus, acompañado por las mejoras sustanciales en el rendimiento del virus. El paso en las células Vero continúa hasta que se logra la estabilidad genotípica y fenotípica, usualmente en pasos en 10 a 15 pasos en serie (P10-P15). Los pasos adicionales del virus más allá del P15 nos mostraron poca o ninguna sustitución adicional y no dieron como resultado el mejoramiento adicional del rendimiento del virus. Este proceso da como resulta en la mejora sustancial en el producto de fabricación así como también la consistencia de fabricación mejorada. Las mutaciones adaptativas no afectaron sustancialmente la neurovirulencia (NV) del virus pasado cuando se probó en un modelo animal NV intracraneano de ratón altamente sensible.

De acuerdo con esto, un aspecto de la invención suministra un virus de la estomatitis vesicular genéticamente modificado, aislado (VSV) que tiene por lo menos una mutación de aminoácido en la región que corresponde a por lo menos una de las siguientes posiciones:

Los aminoácidos en las posiciones 119 o 142 de la proteína M;

Los aminoácidos en las posiciones 109, o 134, 438, 477, o 481 en la proteína G; y

Los aminoácidos en las posiciones 205, 220 o 1450 de la proteína L.

En una modalidad de la invención, el ácido nucleico que codifica el VSV genéticamente modificado comprende además un ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno heterólogo, o un fragmento de este. Se prevé que un antígeno heterólogo, o un fragmento de este, sea de un microorganismo patógeno. El microorganismo patógeno del cual se obtiene el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se puede seleccionar de un grupo que consiste de un virus, una bacteria, un protozoario y un hongo. En una modalidad, el antígeno heterólogo se pueden seleccionar del grupo que consiste de un antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un antígeno HTLV, un antígeno SIV, un antígeno RSV, un antígeno PIV, un antígeno HSV, un antígeno CMV, un antígeno del virus Epstein-Barr, un antígeno del virus de Varicela-Zoster, un antígeno del virus de las paperas, un antígeno del virus del sarampión, un antígeno del virus de la influencia, un antígeno de un poliovirus, un antígeno de un rhinovirus, un antígeno del virus de la hepatitis A, un antígeno del virus de la hepatitis B, un antígeno del virus de la hepatitis C, un antígeno del virus Norwalk, un antígeno de un togavirus, un antígeno de un alfavirus, un antígeno del virus de la rubeola, un antígeno del virus de la rabia, un antígeno de un virus Marburg, un antígeno del virus Ebola, un antígeno del virus papiloma, un antígeno del virus polioma, un antígeno de un metapneumovirus, un antígeno de un coronavirus, un antígeno del *Vibrio cholerae*, un antígeno del *Plasmodium falciparum*, un antígeno del *Plasmodium vivax*, un antígeno del *Plasmodium ovale*, un antígeno del *Plasmodium malariae*, un antígeno *Knowlesi*, un antígeno del *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno del *Streptococcus pyogenes*, un antígeno del *Helicobacter pylori*, un antígeno del *Streptococcus agalactiae*, un antígeno de *Neisseria meningitidis*, un antígeno del *Neisseria gonorrea*, un antígeno del *Corynebacterium diphtheriae*, un antígeno del *Clostridium tetani*, un antígeno del *Bordetella pertussis*, un antígeno del *Haemophilus*, un antígeno de *Chlamydia* y un antígeno de *Escherichia coli*.

241

En una modalidad de la invención, el ácido nucleico que codifica el VSV genéticamente modificado comprende además un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo que es una proteína de la inmunodeficiencia humana (VIH). En una modalidad, la proteína del VIH es codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste del *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* y *vpu.* En una modalidad, la proteína del VIH es una proteína VIH gag. En una modalidad, la proteína VIH gag tiene por lo menos una mutación en la posición 165, 270, 329, o 348.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado tiene una mutación que comprende un cambio de aminoácido conservador o no conservador.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado tiene una mutación que está en cualquier posición 119 o 142 de la proteína M o está en ambas posiciones 119 y 142 de la proteína M. En una modalidad, la mutación del aminoácido en la posición 119 de la proteína M es una mutación T→N y la mutación del aminoácido en la posición 142 de la proteína M es la mutación P→T o mutación P→Q.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado tiene una mutación de los aminoácidos en la posición 109, 224, 438, 477, o 481 de la proteína G que es una mutación K→N, N→T, S→I, A→V/G→L o V →I, respectivamente.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado tiene una mutación del aminoácido en la posición 205, 220 o 1450 de la proteína L que es P → L, K →E, o L→I, respectivamente.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína VIH gag, en donde la proteína VIH gag tiene una mutación en por lo menos uno de los aminoácido en la posición 165, 270, 329 o 348, en donde las mutación es S →G, L→S, D→N o T→K, respectivamente.

En una modalidad, las mutaciones anotadas anteriormente en el VSV genéticamente modificado tienen un resultado en una estabilidad creciente del genotipo del virus y/o el fenotipo. En una modalidad, las mutaciones anotadas anteriormente en el VSV genéticamente modificado dieron como resultado

Organizacion y
Digitalizecion CSA Ltda

2/2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-74482

54. **TÍTULO** _____

_____

_____

_____

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** _____

DOMICILIO _____

74. **APODERADO** _____

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

10-74482

Tomo: 2/2

adicionalmente un rendimiento creciente en la producción del virus de una célula infecta con el VSV genéticamente modificado.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado comprende además por lo menos otras dos mutaciones en su genoma. En una modalidad, las mutaciones se pueden seleccionar del grupo que consiste de una mutación sensible a la temperatura, una mutación puntual, una mutación genética desordenada, una mutación madre G, una mutación del gen M no citopático, una mutación del ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de la inserción del gen G y una mutación de supresión del gen.

Un segundo aspecto de la invención suministra un método para producir el VSV genéticamente modificado como se describió aquí, el método comprende el paso en serie de un VSV en una línea celular mamífera susceptible a una baja multiplicidad de la infección (MOI) que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU)/ml durante por lo menos 5-15 pasadas, en donde el virus tiene un titulo de por lo menos 1 x 10^6 PFU/ml y por lo menos una o más de las mutaciones se describen aquí.

En una modalidad, el método descrito anteriormente da como resultado un virus genéticamente modificado y atenuado que tiene un titulo de por lo menos 1 x 10^7 PFU/ml.

En una modalidad, el método descrito anteriormente utiliza una línea celular susceptible, que es cualquier línea celular que es capaz de ser infectada con el VSV genéticamente modificado como se describió aquí. Por ejemplo, una línea celular susceptible puede incluir pero no está limitada a, una línea de célula Vero, células de riñón de hámster bebé (BHK), una línea celular de riñón embriónica humana, como tal, una línea celular 293.

En una modalidad, el método descrito anteriormente da como resultado en 5 a 100 veces mayor rendimiento del virus comparado con aquel obtenido con la cepa de virus que no se ha pasado durante aproximadamente 5 a 10 veces a un MOI bajo que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU)/ml.

En una modalidad, el método descrito anteriormente da como resultado un incremento en la estabilidad del genotipo y/o el fenotipo del virus.

Un tercer aspecto de la invención suministra una composición inmunogénica que comprende uno cualquiera o más de los VSV genéticamente modificados descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante.

Un cuarto aspecto de la invención suministra un método para proteger un mamífero contra la infección con un microorganismo patógeno, el método comprende administrar una cantidad inmunológicamente efectiva de uno cualquiera o más de las VSV genéticamente modificados como se describió aquí.

Un quinto aspecto de la invención suministra un método para adaptar un virus para crecer en un cultivo celular que comprende.

a. Infectar el cultivo celular con el virus a una multiplicidad de la infección (MOI) que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU) por célula;
b. Cosechar el medio de cultivo celular que contiene el virus,
c. Clarificar el medio de cultivo celular;
d. Congelar el medio de cultivo celular; y
e. Repetir las etapas a) a d) durante aproximadamente 5 a 15 veces.

En donde el métodos da como resultado en un incremento de 5 a 100 veces la producción / rendimiento del virus y un incremento en la estabilidad del genotipo y fenotipo del virus.

En una modalidad, el método descrito aquí utiliza un virus que es un virus atenuado. En una modalidad, el método se adapta para producción a gran escala de una composición inmunogénica vírica. En una modalidad, el método da como resultado un rendimiento 5 a 100 veces mayor del virus comparado con aquel obtenido con la cepa del virus que no se ha pasado durante aproximadamente 5 a 15 veces a una baja multiplicidad de la infección que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa por célula. En una

modalidad, el método descrito anteriormente permite mantener cualquier mutación(s) pre-existente con la atenuación del virus. El o las mutaciones pre-existentes asociadas con la atenuación del virus se pueden seleccionar del grupo que consiste de una mutación sensible a la temperatura una mutación puntual, una mutación genética desordenada, una mutación madre G, una mutación del gen M no citopático, una mutación ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de la inserción del gen G, y una mutación de la supresión del gen. En una modalidad, el método permite mantener un perfil de baja neurovirulencia asociado con la atenuación del virus. En una modalidad, el virus atenuado utilizado en los métodos descritos anteriormente es una cepa del virus de la estomatitis vesicular (VSV). En una modalidad, los métodos descritos anteriormente utilizan un VSV genéticamente modificado que tiene por lo menos una mutación del aminoácido en la región que corresponde a por lo menos una de las siguientes posiciones:

Los aminoácidos en las posiciones 119 o 142 de la proteína M;

Los aminoácidos en las posiciones 109, 224, 438, 477, o 481 de la proteína G; y

Los aminoácidos en las posiciones 205, 220, o 1450 de la proteína L.

En una modalidad, el método descrito aquí utiliza el virus de la estomatitis vesicular que tiene una mutación que comprende un cambio del aminoácido conservador o no conservador. En una modalidad, la mutación puede estar en cualquier posición 119 o 142 de la proteína VSV M o está en ambas posiciones 119 y 142 de la proteína M. En una modalidad, la mutación del aminoácido en la posición 119 de la proteína M es una mutación T→N y la mutación del aminoácido en la posición 142 de la proteína M es una mutación P → T o una P → Q.

En una modalidad, la mutación puede estar en la posición 109, 224, 438, 477, o 481 de la proteína VSV G y puede ser una mutación K→N, N→T, S→I, A→V/G→L, o V→I, respectivamente.

En una modalidad, la mutación puede estar en la posición 205, 220 o 1450 del VSV Lp.

En una modalidad de la invención los métodos descritos aquí utilizan una cepa del VSV que se puede seleccionar del serotipo Indiana (ATCC, VR-1238), un serotipo New Jersey (ATCC, VR-1239), un serotipo Isfahan (PMID:192094), un serotipo Chandipura (ATCC, VR-476), u otros vesiculovirus.

En una modalidad de la invención, en los métodos descritos aquí utilizan una cepa del VSV que contiene un ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno heterólogo. Un antígeno heterólogo que obtiene de un microorganismo patógeno seleccionado del grupo que consiste de un virus, una bacteria, un protozoario y un hongo.

El antígeno heterólogo se puede seleccionar del grupo que consiste de un antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un antígeno HTLV, un antígeno SIV, un antígeno RSV, un antígeno PIV, un antígeno HSV, un antígeno CMV, un antígeno del virus Epstein-Barr, un antígeno del virus de Varicela-Zoster, un antígeno del virus de las paperas, un antígeno del virus del sarampión, un antígeno del virus de la influencia, un antígeno de un poliovirus, un antígeno del rhinovirus, un antígeno del virus de la hepatitis A, un antígeno del virus de la hepatitis B, un antígeno del virus de la hepatitis C, un antígeno del virus Norwalk, un antígeno del togavirus, un antígeno del alfavirus, un antígeno del virus de la rubeola, un antígeno del virus de la rabia, un antígeno del virus Marburg, un antígeno del virus Ebola, un antígeno del virus papiloma, un antígeno del virus polioma, un antígeno del metapneumovirus, un antígeno de coronavirus, un antígeno del *Vibrio cholerae*, un antígeno del *Plasmodium falciparum*, un antígeno del *Plasmodium vivax*, un antígeno del *Plasmodium ovale*, un antígeno del *Plasmodium malariae*, un antígeno *Knowlesi*, un antígeno del *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno del *Streptococcus pyogenes*, un antígeno del *Helicobacter pylori*, un antígeno del *Streptococcus agalactiae*, un antígeno de *Neisseria meningitidis*, un antígeno del *Neisseria gonorrea*, un antígeno del *Corynebacterium diphtheriae*, un antígeno del *Clostridium tetani*, un antígeno del *Bordetella pertussis*, un antígeno del *Haemophilus*, un antígeno de *Chlamydia* y un antígeno de *Escherichia coli*.

En una modalidad, el antígeno Heterólogo comprende una proteína VIH. En una modalidad, la proteína VIH está codificada por un gen seleccionado del grupo

246

que consiste de gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev, y vpu. En una modalidad, la proteína VIH tiene por lo menos una mutación en la posición 165, 270, 329 o 348.

En una modalidad, la mutación del aminoácido de la posición 165, 270, 329 o 348 de la proteína VIH gag es S→G, D→N o T→K, respectivamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1: Organización genómica esquemática de *wt* VSV y el *attn* VSVN4CT1 gag1 (serotipos IN y NJ).

FIGURA 2: Descripción del protocolo experimental utilizado con el virus de paso en serie en células Vero. Los virus en cada 5to paso fueron anodizados mediante los ensayos indicados.

FIGURA 3: Sustituciones adaptativas del aminoácido provenientes del serotipo IN del virus VSV atenuado (rVSVinN4CT1-gag1) luego del paso en serie de las células Vero.

FIGURA 4: Sustituciones adaptadoras del aminoácido que provienen del serotipo NJ del virus VSV atenuado (rVSVnjN4CT1-gag1) luego del paso en serie en las células Vero.

FIGURA 5: Efecto de los niveles de paso en las cinéticas de crecimiento en el serotipo IN del virus rVSVinN4CT1-gag1. Paso en serie que resultan en un incremento significativo en el rendimiento que excede el objetivo de elaboración de ≥ 10^7 PFU/ml. No hubo un cambio significativo en el crecimiento después del paso 15.

FIGURA 6: Efectos de los niveles de paso en las cinéticas de crecimiento del serotipo NJ del virus rVSVnjN4CT1-gag1.

FIGURA 7: Resultados de la prueba de neurovirulencia (NV) del virus pasado rVSVinN4CT1-gag1 P0 a P25 en un modelo animal intracraneano de ratón (IC) LD_{50} como se describió en Cooper et al., J Virology, 82, 207-29, 2008.

Figura 8A-8L: Comparación de las secuencias de nucleótido (NT) y de aminoácido (AA) de los virus originales (paso 0 o P0) y paso 25 del serotipo VSV Indiana. La sustitución es NT y AA en el virus pasado se muestran resaltada.

FIGURA 9A-9M: Comparación de la secuencia de nucleótido (NT) y de aminoácido (AA) de los virus originales (paso 0 o P0) y el paso 25 del serotipo VSV New Jersey. Las sustituciones de NT y AA en el virus pasado se muestras resaltadas.

FIGURA 10: Las cinéticas de crecimiento del Biorreactor VSVinN4CT1-gag1 corren, utilizando un virus de bajo y alto paso.

FIGURA 11: Las cinéticas de crecimiento del Biorreactor VSVnjN4CT1-gag1 corren, utilizando virus de bajo y alto paso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Antes de que se describieran los presentes métodos y metodología del tratamiento se debe entender que ésta invención no está limitada a los métodos particulares, y a las condiciones experimentales descritas, en razón a que tales métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada aquí es con propósitos de describir solamente las modalidades particulares, y no pretende ser limitante.

Como se utiliza en ésta especificación y las reivindicaciones finales las formas singulares "uno", "una" y "el" incluye las referencias plurales a menos que el contexto raramente indique otra cosa. Así, por ejemplo, las referencias al "método" incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo descritas aquí y/o que serán evidentes para aquellas personas expertas en la técnica luego de leer la descripción y así sucesivamente.

De acuerdo con esto en la presente solicitud, se podría emplear biología molecular convencional, microbiología, y técnicas de ADN recombinantes para el experto en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning*: *A Laboratory Manual,* Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning*: *A Practical Approach*,

248

Volumes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds, (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freschney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o prueba de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas aquí se incorporan mediante referencia en su totalidad.

Definición

Los términos utilizados aquí tienen los significados reconocidos y conocidos por aquellos expertos en la técnica, sin embargo, por conveniencia e integridad, los términos particulares y sus significados se establecen adelante.

El término "aproximadamente" significa dentro del 20%, preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5%.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un sistema linfoide activador que mejora no específicamente la respuesta inmune (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamín/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). Dependiendo de las circunstancias una exposición primaria con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, puede fallar para provocar una respuesta inmune humoral o célula suficiente. Un número de citoquinas y linfoquinas han mostrado que tienen actividad moduladora inmune y así son útiles como adyuvante, incluyen, pero no estando limitadas a, las interluquinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (Ver, por ejemplo, Patente U.S. No 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones-α, β y γ; el factor estimulante de colonia de granulosito-macrófago (GM-CSF) (ver, por ejemplo, Patente U.S No 5,078,996 y el Número de Acceso a ATCC 39900); el factor estimulante de colonia de macrófago (M-CSF), el factor estimulante de colonia de granulocito (G-CSF); y los factores de necrosis tumoral α y

β. Aun otros adyuvantes que son útiles en las composiciones inmunogénicas descritas aquí incluyen quimioquinas incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β y rantes; las moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo la selectina L, la selectina P y la selectina E; moléculas similares a mucina, por ejemplo CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia integrina tal como el LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de la inmunoglobulina tal como el PECAM, ICAMs, por ejemplo ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas co-estimulatorias tales como CD40 y CD40L; factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento de fibroblasto, el factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1, y el factor de crecimiento endoterial vascular; las moluelas receptoras que incluyen el Fas, el receptor TNF, el Flt, el Apo-1, el p55, el WSL-1, DR3, TRAMP, el Apo-3, el AIR, el LARD, el NGR., el DR4, DR5, Killer, Trail-R2, Trick2, y DR6; y la Caspasa (ICE).

Los adyuvantes adecuados utilizados para mejorar la respuesta inmune incluyen además sin limitación, MPL™ (lípido A monofosforilo 3-O-desacilado, corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente U.S. No 4.912,094. También adecuado para uso como adyuvantes son los análogos sintéticos de lípido A o los compuestos de aminoalquil glucosalino fosfato (AGP), o derivados o análogos de estos, que están disponibles de colixa (Hamilton, MT), y que se describen en las patentes Estadounidenses No 6,113,918. Uno de tales AGP es el 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosido que también es conocido como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

Aun otros adyuvantes incluyen los pépticos muramilo, tales como el N-acetil-muramil-L-threonil-D-isoglutamina (thr-MDP), el N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoyl-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tales como el MF59 (Publicación PCT Internacional No WO 90/14837) (que contiene 5% de escaleno, 0.5% Tween 80, y 0.5% de Span 85 (que contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE) formuladas en partículas submicrónicas que utilizan el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, Ma)), y el SAF (que contiene 10% de escaleno, 0.4% de Tween 80, 5% de polímero

250

bloqueado plurónico L121 y el thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicronica o sometido a vortexed para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor); adyuvante de Freund's incompleto (IFA); sales de aluminio (alumbre), tales como hidroxido de aluminio fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; amfigeno; Avridina; L121/escaleno; D-lactudo-polilactudo/glucocido, polioles plurónicos; *Bodetella* muerta, saponilas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descrita en la Pantente U.S No 5,057,540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descrita en la Patente U.S. No 5,254,339 y los complejos inmunoestimulantes (ISCOMS); el *Mycobacterium tuberculosis*; los lipopolisacáridos bacterianos, los polinucleótidos sintéticos tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (por ejemplo la Patente U.S No 6,207,646); el IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), descrita en las Patentes Europeas Nos 1,296,713 y 1,326,634; la toxina pertusis (PT) o un mutante de ésta o una toxina o mutante del cólera de ésta (por ejemplo, la publicación PCT Internacional No WO00/18434, WO02/098368 y WO02/098369); o una toxina labil al calor de E.Coli (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; ver, por ejemplo, Publicación PCT Internacional No WO 93/13302 y WO 92/19265.

El término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición o sustancia inmunogénica que pueda estimular la producción de anticuerpos a una respuesta de la célula T, o ambos, en un animal, que incluyen composiciones que son inyectadas o adsorbidas a un animal. La respuesta inmune se puede generar para la molécula completa o para una porción de la molécula (por ejemplo un epítopo o hapteno). El término se puede utilizar para referirse a una macromolécula individual o a una modulación homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral y/o celular específica. El término "antígeno" comprende ampliamente grupos funcionales que incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteína antigénica, ácidos nucleicos, oligosacáridos, polisacáridos, químicos o composiciones orgánicas o inorgánicas, y similares. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de bateo de epítopo, bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar mediante por ejemplo, números grandes concurrentemente sintetizados de péptido sobre soporte sólidos, los pépticos corresponden a porciones de la

molécula de proteína, y hacen reaccionar los pépticos con anticuerpos mientras que pépticos están aun unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el arte y se describen en, por ejemplo, la Patente U.S No 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715, todas incorporadas aquí como referencia en su totalidad. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente al determinar la conformación espacial de los aminoácidos tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos-x y resonancia magnética nuclear 2-dimensional. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Adicionalmente, para los propósitos de la presente invención, un "antígeno" se puede utilizar para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora, pero ellas pueden ser no conservadoras), a la secuencia nativa, en tanto que de la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones se pueden deliberar, como a través de mutagenia dirigida de sitio o a través de procedimientos sintéticos particulares, o a través de una aproximación de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes, que producen los antígenos. Adicionalmente, el antígeno se puede derivar u obtener de cualquier virus, bacteria, parasito, protozoario, u hongo, y puede ser un organismo completo. De manera similar, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno, tal como en las aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también está incluida en la definición. También se incluyen los antígenos sintéticos, por ejemplo, los poliepítopos, los epítopos de flanco, y otros antígenos recombinante o sintéticamente derivados (Bergmann et al. (1993) Eur.J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75:402 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 Jul. 3, 1998).

El término "atenuado" se refiere a una cepa de patógeno cuya patogenia se ha reducido de tal forma que ésta iniciara una respuesta inmune sin producir la enfermedad específica. Una cepa atenuada de un virus es menos virulenta que la cepa parental de la cual esta se deriva. Los medios convencionales se utilizan para introducir mutaciones atenuadas para generar un virus modificado, tal como la mutagenia química durante el crecimiento del virus en el cultivo celular es a los cuales se ha agregado el mutágeno químico. Unos medios alternativos para introducir las mutaciones atenuadas comprenden hacer mutaciones predeterminadas utilizando

mutagenia dirigida de sitio. Se puede introducir una mal mutación. Estos virus que seleccionan para atenuación de su actividad biológica en el cultivo celular y/o en un modelo animal. Si el fenotipo atenuado del virus rescatado está presente, se pueden conducir experimentos de exposición con un modelo animal apropiado. Los primates no humanos pueden servir como un modelo animal apropiado para la patogenia de la enfermedad humana. Estos primates son inmunizados primero con el virus atenuado, recombinantemente producido, luego inoculado con la forma tipo silvestre del virus.

Los términos "célula", "célula huésped", "cultivos en la célula" y similares como se utilizan aquí pretenden incluir cualquier célula individual o cultivo celular que pueda ser o haber sido receptora de virus, vectores o la incorporación de moléculas de ácido nucleico exógenas polinucleótidos y/o proteínas. También se pretende incluir la progenie de una célula única. Sin embargo, la progenie puede ser no necesariamente completamente idéntica en morfología o en genomita o en el complemento de ADN total. Con la célula padre original debido a la mutación natural, accidental, o deliberada. Las células son preferiblemente eucarióticas, pero pueden ser procarióticas e incluir, pero no están limitadas a, células bacterianas, células de levadura, células animales, y células de mamífero (por ejemplo murino, rata, simio o humano).

El término "clarificar" como se utiliza aquí se refiere a una etapa temprana en la purificación del virus, por medio del cual las células y los desechos celulares se remueven después de la infección de las células o un cultivo celular o el virus de la presente invención. Por ejemplo, en una etapa temprana en la purificación del virus involucra "Clarificar" el medio de cultivo celular para remover los desechos celulares utilizando un método tal como centrifugación a baja velocidad (≤ 10.000 RPM) o filtración. El virus presente en el sobrenadante es luego aislado y purificado utilizando los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, tal como centrifugación ha alta velocidad o (por ejemplo 100.000 x g) a través de u soporte de sacarosa o el aislamiento a través de una columna de intercambio de ión tal como aquella descrita en la Publicación de Patente U.S No 20070249019.

Se nota que en ésta descripción, los términos tales como "comprende", "comprendidas", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener los significados atribuidos al tema en la ley de patentes de los estados unidos. Por ejemplo, ellos pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares.

términos tales como "que consiste esencialmente" y "consiste esencialmente de" tienen el significado atribuido a ellos en la ley de Patente de los Estados Unidos, por ejemplo, a ellos permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no afectan las características novedosas o básicas de la invención, es decir, ellas excluyen ingredientes no citados adicionales o etapas que quitan las características novedosas o básicas de la invención, y ellas excluyen ingredientes o etapas de la técnica anterior, tales como los documentos en la técnica que se citan aquí o se incorporan mediante referencia aquí como especialmente como es la meta de este documento para definir las modalidades que son patentables, por ejemplo, novedosas, novias, inventivas sobre la técnica anterior, por ejemplo, sobre los documentos citados aquí o incorporados mediante referencia aquí. Y, los términos "consiste de" y "que consiste de "tienen los significados descritos a ellos en la ley de Patente de los Estados Unidos; a saber, que estos términos terminan de manera cerrada.

Una "sustitución de aminoácido conservadora se refiere a la sustitución de uno o más de los residuos de aminoácido de una proteína con los otros residuos de aminoácido que tiene propiedades físicas y/o químicas similares. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia se puede selección de otros miembros de la clase a la cual pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobo) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructura de anillo aromática son fenilalanina, triptofano y tiroxina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisterna, tiroxina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina. Los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Tales alteraciones no se espera que afecten el peso molecular aparente tal como se determino mediante electroforesis de gel de poliacrilamida o punto isoeléctrico. Las sustituciones particularmente preferidas son Lys por Arg y viceversa de tal manera que se puede mantener una carga positiva Glu por Asp y viceversa de tal manera que se puede mantener una carga negativa; Ser por Thr de tal forma que se puede mantener el –OH libre; y Gln por Asn de tal forma que se puede mantener el NH_2 libre.

254

Los términos "fluido de cultivo de células, medio de cultivo de célula", "media" y/o "fluido de birreactor" se utilizan intercambiablemente, y se refieren al medio o solución en el cual crece el cultivo de célula.

"Codificado por" o "que codifica" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de polipéptido, en donde la secuencia de polipéptido contiene una secuencia de aminoácido de por lo menos 3 a 5 aminoácidos, más preferiblemente por lo menos 8 a 10 amino ácidos, ya aun más preferiblemente por lo menos 15 a 20 amino ácidos, un polipéptido codificado por las secuencias de ácido nucleico. También comprendidas están las secuencias de polipéptido, que son inmunológicamente identificables con un polipéptido codificado por la secuencia. Así, una secuencia de "polipéptido", "proteínas" o "amino acido" antígeno puede tener por lo menos 70% de, preferiblemente por lo menos aproximadamente 80% de similitud, más preferiblemente aproximadamente 90-95% de similitud, y más preferiblemente aproximadamente 99% de similitud, con una secuencia de polipéptido o aminoácido de un antígeno.

"Fragmento" se refiere a cualquier proteína o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de por lo menos cuatro residuos de aminoácido (preferiblemente, por lo menos 10 residuos de aminoácido, por lo menos 15 residuos de aminoácido, por lo menos 20 residuos de aminoácido por los menos 25 residuos de aminoácido, por lo menos 40 residuos de aminoácido, por lo menos 50 residuo aminoácido, por lo menos 60 residuos de aminoácido, por lo menos 70 residuos de aminoácido, por lo menos 80 residuos de aminoácido, por lo menos 90 residuos de aminoácido, por lo menos 100 residuos de aminoácido, por lo menos 125 residuos de aminoácido, o por lo menos 150 residuos de aminoácido) de la secuencia de aminoácido de la proteína o polipéptido padre o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleico de por lo menos 10 pares base (preferiblemente por lo menos 20 pares base, por lo menos 30 pares base, por lo menos 40 pares base, por lo menos 50 pares base, por lo menos 100 pares base, por lo menos 200 pares base) de la secuencia de nucleótido del ácido nucleico padre. Cualquier fragmento dado puede o puede no poseer una actividad funcional del ácido nucleico padre o proteína o polipéptido.

Un "gen" como se utiliza en el contexto de la presente invención es una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico (cromosoma, plásmido,

etc.) con la cual se asocia la función genética. Un gen es una unidad hereditaria, por ejemplo de un organismo, que comprende una secuencia de polinucleótido (por ejemplo una secuencia de ADN para mamíferos) que ocupa un sitio físico específico (un "locus de gen" o un "locus genético") dentro del genoma de un organismo. Un gen puede codificar un producto expresado tal como un polipéptido o un polinucleótido (por ejemplo tARN). De manera alternativa, un gen puede definir un sitio genómico o una localización genomita para un evento/función particular, tal como la unión de las proteínas y/o los ácidos nucleicos (por ejemplo sitios de unión de fago) en donde los genes no codifican un producto expresado. Típicamente, un gen incluye secuencias codificantes, tales como secuencias que codifican el polipéptido, y secuencias no codificantes, tales como las secuencias promotoras, las secuencias de poli-adenilación, las secuencias regulatorias transcripcionales (por ejemplo las secuencias mejoradoras). Muchos genes eucarióticos tienen "exones" (secuencias codificantes) interrumpidas por "intrones" (secuencias no codificantes). En ciertos casos, un gen puede compartir secuencias con otro gen(s) (por ejemplo genes traslapantes). El término "gen" puede o no incluir secuencias de ADN regulatorias, tales como las secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones bajo las cuales se expresan gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, se pueden transcribir del ADN al ARN, pero no son traducidas en una secuencia de aminoácido. Otros genes pueden funcionar como reguladores de los genes estructurales o como reguladores de la trascripción del ADN.

Como se definió aquí, los términos " mezcla de gen", "gen mezclado", "mezclado", "mezcla", "redisposición de gen" y "transposición de gen" se utilizan intercambiablemente, y se refieren a un cambio (mutación) en el orden del genoma VSV tipo silvestre. Como se define aquí, el genoma VSV tipo silvestre tiene el siguiente orden de ejemplos: 3'-NPMGL-5'.

El término "genéticamente modificado" se refiere de manera general a la introducción de una o más mutaciones en el genoma vial por cualquier medio conocido por aquellos expertos en la técnica. Sin embargo, mientras ciertas "modificaciones genéticas" se pueden hacer mediante supresiones, inserciones y sustituciones específicas, o al transferir material genético al genoma vírico utilizando técnicas de ingeniería genética estándar, ciertas modificaciones genéticas del genoma VSV en la presente invención ocurrieron por el paso continuo de un VSV atenuado una baja multiplicidad de infección. Este paso en serie del MOI bajo da

como resultado un aumento progresivo del número de sustituciones del nucleótido a través del genoma vírico y también dan como resultado las sustituciones de aminoácido en las proteínas VSV. Estas partículas VSV "genéticamente modificadas" se mostraron por estar adaptadas al crecimiento incrementado en las células pero sin la neuropatología incrementada en los modelos animales para neurovirulencia. La presente invención, un virus de paso bajo "paso 0" o "P0" y "virus original" se utilizan intercambiablemente y representan el virus rVSVN4CT1gag1 que sirvió como el material de partida para el virus genéticamente modificado de la presente invención. En algunos casos, particularmente en las corridas del birreactor, estas también incluyen virus pasados 1 a 3 veces para indicar virus de paso bajo. "virus de paso alto", "virus pasado", "virus genéticamente modificado", "tejido adaptado a cultivo", o "virus adaptado a células" se utilizan intercambiablemente y representan virus que han sido pasados más de 5 veces, generalmente 5 a 25 veces, preferiblemente 15 veces.

El término "crecer" o "crecido", como se utiliza aquí se refiere a la propagación *in vitro* del virus en las células de varias clases. La crecida/crecimiento del virus en las células en el laboratorio involucra inocular las células con el virus, seguida por la incubación para permitir la producción del virus y luego cosechar el medio de cultivo celular que contiene el virus. Las células infectadas con virus crecen normalmente en un medio de crecimiento dentro de los recipientes de cultivo (tal como recipientes o platos para células adherentes o botellas o recipientes de movimientos continuos para células en suspensión) y se mantienen los cultivos en las incubadoras celulares con temperatura, humedad y composición de gas constante. Sin embargo, las condiciones de cultivo pueden varias dependiendo del tipo de célula y se pueden alterar para introducir cambios en las células o para sostener o mejorar la producción de virus por las células.

El término "cosechar" como se utiliza aquí se refiere a la conexión de células o medio de cultivo celular en la preparación para el aislamiento y purificación de virus luego de la infección de una célula o línea celular con cualquiera de las cepas de virus o serotipos descritos aquí.

El término "heterólogo" se refiere a una combinación de elementos de ocurrencia no natural en un virus o célula. Por ejemplo, el ADN heterólogo se refiere al ADN no naturalmente localizado en la célula, o en un sitio cromosómico de la

célula el ADN heterólogo puede incluir un gen externo a la célula. El término "antígeno heterólogo" como se utiliza aquí es un antígeno codificado en una secuencia de ácido nucleico, en donde el antígeno no es del organismo, o no está codificado en su posición normal o su forma nativa. Un elemento regulatorio de expresión heteróloga es un elemento operativamente asociado con un gen diferente de aquel que está operativamente asociado dentro de la naturaleza. El término "composición inmunogénica" se relaciona con cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo, un microorganismo, cuya composición se puede utilizar para provocar una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune puede incluir una respuesta de célula T, una respuesta de célula B, o tanto una respuesta de célula T como de célula B. En la composición puede servir para sensibilizar el mamífero mediante la representación del antígeno en asocio con las moléculas de MHC en la superficie celular. Además, en los linfocitos o anticuerpos T específicos de antígeno se pueden generar para permitir la futura protección de un huésped inmunizado. Una "composición inmunogénica" puede contener una formulación viva, atenuada, o muerta/inactivada que comprende el microorganismo completo o una porción inmunogénica derivada de este que induce una respuesta inmune mediada por célula (célula T9 o una respuesta inmune mediada por anticuerpo (célula B) o ambas, y pueden proteger el animal de uno o más síntomas asociados con la infección por el microorganismo, o pueden proteger el animal de muerte debido a la infección con el microorganismo.

Una "cantidad inmunológicamente efectiva" o una "cantidad inmunogénicamente efectiva" como se utiliza aquí se refiere a la cantidad de antígeno o formulación suficiente para provocar una respuesta inmune, o una respuesta celular (célula T) o humoral (célula B o anticuerpo), medida mediante ensayos estándar conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, con respecto a la presente invención una "cantidad inmunológicamente efectiva" es una dosis de protección mínima (titulo) de ≥5.0 a 7.0 Log_{10}pfu/mL. La efectividad de un antígeno como un inmunógeno, se puede medir mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de una célula T alisar su célula objetivo especifica, o al medir los niveles de la actividad de célula B, al medir los niveles de los anticuerpos circulantes específicos para el antígeno en el suero. Adicionalmente, el nivel de protección de la respuesta inmune se puede medir al exponer el huésped inmunizado con el antígeno que se ha inyectado. Por ejemplo, si el antígeno del cual se desea una respuesta

inmune es un virus o una célula tumoral, el nivel de producción inducido por la cantidad inmunológicamente efectiva "del antígeno se mide al detectar el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de las exposiciones víricas, bacterianas y de protozoarios o fungosas de los animales.

El término "aislado" o "purificado" significa que el material se remueve de su ambiente original (por ejemplo el ambiente natural si este es de ocurrencia natural). Por ejemplo, un péptido "aislado" o "purificado" está sustancial libre de material celular u otras proteínas contaminantes de fuente celular o de tejido de la cual se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. La presente invención, el virus es aislado o purificado de los desechos de la célula infectada o de los desechos celulares de tal forma que se suministra una forma útil en la elaboración de una composición inmunogénica. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un virus, un polipéptido/proteína en la cual el virus, o la polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de la cual ésta se aísla o produce recombinantemente. Así, un virus, o un polipéptido/proteína que sea sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del virus o polipéptido/proteína que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, o 1%, (de peso en seco) de la proteína contaminante. Cuando el virus o polipéptido/proteína se produce de manera recombinante, también este está preferiblemente de manera sustancial libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, o 0.2% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido/proteína se produce mediante síntesis química, este está preferiblemente libre de precursores químicos u otros químicos, es decir, este se separa de los precursores químicos u otros químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. De acuerdo con esto tales preparaciones del polipéptido/proteína tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (de peso seco) de precursores químicos o compuestos diferentes del fragmento de interés del polipéptido/proteína. Una molécula de ácido nucleico "aislada" o "purificada" es aquella que se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Más aún, una molécula de ácido nucleico "aislada" tal como una molécula de cADN o una molécula de ARN, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes o sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente.

El término "multiplicidad de infección" o "MOI" se refiere al número promedio de partículas víricas que infectan una célula única. "MOI" se calcula al dividir el número total de unidades formadoras de placa vírica (PFU) con el número total de células que están infectadas.

Como se define posteriormente los términos "clase de mutación", "clases mutación", "clases de mutación" se utilizan de manera intercambiable, y se refieren a mutaciones conocidas en la técnica cuando se utilizan simplemente, para atenuar el VSV. Por ejemplo, una "clase de mutación" de la invención incluye, pero no está limitada a, una mutación VSV del gen N sensible a temperatura (si en lo sucesivo, "$N_{(ts)}$"), una mutación del gen L sensible a temperatura (en lo sucesivo, "$L_{(ts)}$"), una mutación puntual una mutación madre G (en lo sucesivo "$G_{(submadre)}$"), una mutación del gen M no-citopática (en lo sucesivo, "$N_{(ncp)}$"), una mutación de mezcla o redisposición de gen, una mutación del gen G truncado (en lo sucesivo, "$G_{(ct)}$"), una mutación ARN ambisentido, una mutación de la inserción gen G, una mutación de supresión del gen y similar. Como se define posteriormente, una "mutación" incluyen mutaciones conocidas en la técnica como inserciones, supresiones, sustituciones, redisposición de gen o modificaciones de mezcla. Una "sustitución de aminoácido no conservadora" se refiere a la sustitución de uno o más de los residuos de aminoácido de una proteína con los otros residuos de aminoácido que tienen propiedades físicas y/o químicas no similares, que utilizan las características definidas anteriormente.

Como se utiliza aquí, la frase "acido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, así como también cualquiera de los análogos de base conocidos del ADN y ARN o quimeras formadas de ésta. Así, un "acido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina, o histidina; cuyas moléculas de ARN") o desoxiribonucleósidos (desoxiadenocina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; "moléculas de ADN") en forma de cadena única, o una hélice de doble cadena. Las hélices de ADN y un ADN de doble cadena, ADN -ARN y ARN –ARN son posibles. El término molécula de ácido nucleico, y en particular moléculas de ADn o ARN, se refieren solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no limitan a ninguna forma terciaria particular. Así como este término incluye ADN de doble cadena encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo fragmentos de restricción) plásmidos, y cromosomas. Al discutir la estructura

260

de las moléculas de ADN particulares de doble cadena, se pueden describir secuencias aquí de acuerdo con la convención normal de dar solamente las secuencias en la dirección 5N a 3N a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir la cadena que tiene la secuencia homologa al mARN). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular.

El término "patógeno" se refiere a la capacidad de cualquier agente de infección, tal como una bacteria o virus, originar enfermedad. Un microorganismo "no patógeno" se refiere a microorganismos que les falta la enfermedad que origina las características de la cepa "patógena" de un microorganismo.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un portador aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal, estatal, u otra agencia regulatoria, oliestado en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para usado en animales, incluyendo humanos así como también mamíferos no humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra la composición farmacéutica. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de sésamo y similar, el agua es un portador preferidos cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanoles similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes amortiguantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, tabletas, píldoras, capsulas, polvos, formulaciones de duración sostenida y similares. La composición se puede formular como supositorio, con los ligadores y los portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. La formulación se debe adecuar al modo de administración. El término "placa" o "placa vírica" se refiere a un parche claro, a menudo redondo de células lisadas en una capa de otra manera opaca de un cultivo celular. Una "unión formadora de placas" o una "PFU" se refiere al número promedio de partículas de partículas víricas infecciosas por volumen unitario. Por ejemplo, si una solución vírica tiene 100 PFU/ml esto significa que cada un mililitro de ésta solución vírica tiene 100 partículas de virus que pueden formar cada una placa. PFU/ml son los medios convencionales para referirse a una concentración de una preparación de virus formadora de placa. Sin embargo el PFU se utiliza generalmente de manera intercambiable con la "unidad infecciosa" o "IU" y representa unidades de virus infecciosos en una preparación vírica.

El término "proteger" se refiere a producir por ejemplo un mamífera, de infección o una enfermedad, al inducir una respuesta inmune a un patógeno particular. Tal protección se logra en general luego de tratar un mamífero con una composición inmunogénica. La protección suministrada no necesita ser soluble, es decir, una infección no necesita ser evitada o erradicada completamente, si existe una mejora estadísticamente significativa comparada con una población de control de mamíferos, por ejemplo, animales infectados a los que no se les ha administrado las composiciones inmunogénicas. La protección se puede lograr al mitigar la severidad o rapidez del inicio de los síntomas de la infección.

Los términos "proteínas", "polipéptido", y "péptido" se refieren a un polímero de residuos de aminoácido que no está limitado a una longitud mínima del producto. Así, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares están incluidos dentro de la definición. Ambas proteínas y fragmentos de longitud completa de ésta están comprendidos por la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora, pero que pueden ser no conservadoras), a una secuencia nativa, preferiblemente de tal forma que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica dentro de un animal al cual se administra la proteína. También se incluye modificaciones post-expresión, por ejemplo glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. El término "aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido natural y/o no natural o sintético que incluye tanto los isómeros D o L, y

los análogos de aminoácido. La letra y los tres códigos de letra para cada uno de los aminoácidos son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los métodos de producir virus de ARN recombinante se denominan en la técnica como "métodos de "rescate" o "genética inversa". Los métodos de rescate de ejemplo para VSV se describen en la Patente U.S 6,033,886, la Patente U.S. 6,596,529 y WO 2004/113517, que se incorpora cada uno aquí como referencia. La transcripción y replicación de los genomas víricas de ARN de codificación negativo, cadena única, no segmentados se logran a través de la actividad enzimática de un complejo de proteína multimérico que actúa sobre el núcleo de la ribonucleoproteína (nucleocápsido). El ARN genómico desnudo puede no servir como una plantilla. En su lugar, estas secuencias genómicas se reconocen solamente cuando ellas están completamente encapsidadas por la proteína N en la estructura del nucleocápsido es solo en ese contexto que las secuencias promotoras terminales genómicas y antegenómicas se reconocen para iniciar las sendas transcripcionales o de replicación.

Como se define, posteriormente, el término atenuación "sinérgica" se refiere al nivel de atenuación VSV que es mayor que la adición. Por ejemplo, una atenuación sinérgica de VSV va de acuerdo con la presente invención comprende combinar por lo menos dos clases de mutación en el mismo genoma VSV, dando como resultado de ésta manera una reducción de la patogenia VSV mucho mayor que un nivel de atenuación aditivo observado para cada clase de mutación VSV sola. Así, en ciertas modalidades, una atenuación sinérgica del VSV se define como el un LD_{50} por lo menos mayor que el nivel de atenuación aditivo observado para cada clase de mutación sola (es decir la suma de las dos clases de mutación) en donde los niveles de atenuación (es decir, el LD_{50}) se determina en un modelo de neurovirulencia de animal pequeño. Ejemplos de atenuación sinérgica del VSV se describen en la WO2005/098009, incorporada aquí como referencia.

Una mutación "sensible a la temperatura" ("ts") VSV como se define posteriormente es una mutación en el genoma VSV que restringe el crecimiento VSV a una temperatura no permisiva. Por ejemplo, el mutante VSV ts de la infección crece normalmente y con alto titulo a una temperatura permisiva (por ejemplo 31°C), pero su crecimiento o reproducción se restringe a temperaturas no permisivas (por ejemplo 37°C o 39°C).

El término "composición inmunogénica" se refiere a composiciones farmacéuticas que inducen una respuesta inmune en un animal. Una composición inmunogénica puede proteger el animal de enfermedad o posible muerte debido a la infección, o puede o no incluir uno o más componentes adicionales que mejoren la actividad inmunológica del componente activo. La composición inmunogénica puede comprender más componentes típicos a las composiciones inmunogénicas, que incluyen, por ejemplo un adyuvante o un inmunomodulador. El componente inmunológicamente activo de la composición inmunogénica puede comprender organismos vivos completos en su forma original o como organismos atenuados, u organismos inactivados mediante métodos apropiados en composiciones inmunogénicas muertas o inactivadas, o en composiciones inmunogénicas o unitarias que comprenden uno o más componentes inmunogénicos del virus, o trabajados por ingeniería genética, composiciones inmunogénicas mutadas o clonadas preparadas por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Una composición inmunogénica puede comprender una o simultáneamente más de un elemento descrito anteriormente.

Descripción General

De acuerdo con la presente invención se suministra un proceso o un método para la adaptación de un VSV recombinante altamente atenuado a las condiciones de cultivo de tejido mediante el paso continuo a baja multiplicidad de la infección (MOI) en células Vero o en cualquier sustrato de células susceptible. El proceso de paso en serie múltiple da como resultado cambio genotípico caracterizado por acrecentamiento progresivo de un número de sustituciones de nucleótido a través del genoma vírico. La mayoría de estas sustituciones de nucleótido dan como resultado sustituciones de aminoácido (AA) en las proteínas VSV. Este proceso da como resultado la adaptación genotípica del virus, acompañada por mejorar sustanciales en el rendimiento del virus. El paso en las células Vero continúa hasta que se logra la estabilidad genotípica y fenotípica, usualmente en 10 a 15 pasos en serie (P10- P15). Los pasos adicionales del virus más allá del P15 muestran poca o ninguna sustitución adicional y no dan como resultado el mejoramiento adicional de los rendimientos del virus este proceso resulta en una mejora sustancial en el rendimiento de elaboración así como también la consistencia de elaboración mejorada. Las mutaciones adaptativas no afectan sustancialmente la neurovirulencia (NV) del virus pasado

264

cuando se prueba en un modelo de animal NV intracraneano de ratón altamente sensible.

De acuerdo con la Publicación de Patente U.S No 2007/0218078A1, se genero un vector VSV altamente atenuado que expresa el gen VIH-1 gag, rVSVN4CT1-gag1, que se hizo al combinar aproximaciones de tres virus atenuantes por: inserción del gen VIH-1 gag en la primera posición del genoma (gag1), cambiando de ésta manera todos los genes VSV desde el promotor 3' en una posición, traslocación del gen VSV N a la posición 4ta (N4) y el uso de un VSV G con su cola citoplasmática truncada a un aminoácido (CT1) (Schnell, et al. The EMBO Journal 17:1289-1296, 1998). Comparado con el rVSV prototipito, este vector despliega un incrementa marcado en la atenuación in vitro caracterizado por el fenotipo de placa más pequeño, las cinéticas de crecimiento suprimidas y los títulos de pico mayormente reducidos en el cultivo celular. Un patrón similar de atenuación se desplegó cuando se probo en un modelo animal intracraneano de murino altamente sensible (IC), que mostró las diferencias en el LD_{50} de muchos órdenes de magnitud entre el VSV prototipito y atenuado (Cooper et al, J. Virology, 82:207-229, 2008). Además, comparado con el VSV prototipito el virus atenuado desplegó neuropatología mínima a indetectable en primates no humanos. Aunque este vector induce respuestas inmunes potentes en ratones y macacos que fueron comparables con aquellas obtenidas con el vector del prototipo este replica pobremente en cultivo de células haciendo su óptimo para la producción a escala y elaboración.

Con base en la animación de la seguridad preclínica y el perfil de inmunogenicidad, este vector seria un candidato a vector promisorio para pruebas en humanos. Dos factores que son críticos para la prueba de este vector en humanos son la estabilidad de las tres mutaciones atenuantes anotadas anteriormente y los rendimientos de elaboración crecientes. En el presente estudio, se condujeron estudios de estabilidad genética, que consistían de varios pasos de vectores rVSV en células Vero. Los virus fueron pasados en células Vero a baja multiplicidad de infección (MOI, 0.01). Los datos obtenidos de los virus pasados 25 veces revelan que mientras que todas las mutaciones que atenúan los tres vectores se retuvieron, las sustituciones de los aminoácidos adicionales (AA) aparecieron tan temprano como en el paso 5 (P5). Como los virus fueron pasados adicionalmente, las mutaciones se fijaron en el paso 15 (P15). Además, las cinéticas de crecimiento de los virus pasados en las células Vero mostraron la mejora progresiva del rendimiento de los virus hasta

el P15, sugiriendo que el acrecentamiento de las sustituciones AA represento una adaptación continua del virus a las células Vero. Ningún mejoramiento adiciona en la producción de virus fue vista después de P15. Los resultados de las cinéticas de crecimiento con los virus pasados indicaron que el rendimiento del virus con el virus P15 fue 5 a 100 veces mayor que aquel obtenido con P0 (ver Figuras 3-6).

De acuerdo con esto, esta invención demuestra que los virus P15 exhiben estabilidad genotípica y fenotípica y crecen a niveles adecuados para la elaboración a gran escala del material de ensayo clínico adecuado para la evaluación toxicológica y clínica.

Células adecuadas para el crecimiento de la propagación del VSV

Las células huéspedes adecuadas para uso dentro de la invención son capaces de soportar una infección productiva del VSV atenuado genéticamente modificado, y permitirá la expresión de los vectores requisito y sus productos codificados necesarios para soportar la producción vírica. Ejemplos de células huéspedes para uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, las células Vero, las células de riñón de hámster bebé (BHK), y las células de riñón embriónicas humanas (HEK), tal como las células 293. Cualquier otra célula que sea susceptible de infección con las cepas de VSV atenuadas genéticamente modificadas o los serotipos descritos aquí se puede utilizar en los métodos de la invención.

Producción del VSV en un cultivo celular de mamífero.

La producción del VSV en el cultivo de célula de mamífero es bien conocida por un experto en la técnica, y generalmente incluye infectar el cultivo de célula (célula huésped) con el VSV, hacer crecer el VSV en el cultivo celular y cosechar el cultivo celular en el momento apropiado. En razón a que el VSV se secreta de la célula huésped en el medio, el producto VSV se reconecta del fluido de cultivo celular.

La producción del VSV del cultivo celular de mamífero emplea cultivos celulares de mamífero adecuados utilizados para propagar (o hacer crecer) el VSV, que es conocido en la técnica. Tales cultivos celulares incluyen, pero no están

limitados a, células de riñón embriónica humana (HEK) tal como las células HEK 293, las células de riñón de mono verde Africano (AGMK) tal como las células Vero, las células de ovario de hamster Chino (CHO) y las células de riñón de hámster bebé (BHK).

Adicionalmente, los materiales de cultivo celular, los métodos y las técnicas son bien conocidos por aquellos expertos en el arte. Por ejemplo, un almacenamiento de semilla VSV recombinante se utiliza para infectar una población de células huéspedes confluente a una población de célula huésped a una cierta densidad (por ejemplo un cultivo de célula Vero) en un birreactor a una multiplicidad dada de infección; el VSV crece en el cultivo celular durante un tiempo y temperatura dadas; y la progenie VSV naciente cosechada en el fluido de cultivo de célula. Como se define posteriormente, los términos "fluido de cultivo", "fluido de cultivo celular", "medio de cultivo celular", "medios" y/o "fluido biorreactor" se utiliza intercambiablemente, y se refiere al medio o solución en la cual crece el cultivo.

Purificación del VSV proveniente de un cultivo de célula de mamífero

Los procesos para purificar el VSV proveniente del fluido de cultivo celular de un cultivo celular de mamífero infectado con el VSV son generalmente conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo como se describió en Millar et al. (Protein Expression and Purification, Vol. 33, Issue 1, January 2004, pp.92-103), el sobrenadante del cultivo que contiene el virus se puede recolectar y someter a una centrifugación a baja velocidad (por ejemplo 1000 x *g*) para remover las células y los desechos, seguida por centrifugación a alta velocidad (por ejemplo 100,000 x g) sobre una almohadilla de sacarosa del 20% para remover el virus.

Otro método para la purificación del VSV proveniente del cultivo celular se describe en la Publicación de Patente U.S. 2007/0249019. En resumen, este procedimiento incluye las etapas de (a) clarificación primaria, (b) clarificación secundaria, (c) adsorción de membrana de intercambio de anión, (d) filtración de lujo tangencial y (e) filtración. Mas particularmente, tales etapas comprenden (a) clarificar el fluido de cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad, (b) clarificar adicionalmente el sobrenadante mediante filtración a través de un filtro de 0.2 a 0.45 micrómetros, (c) purificar la solución filtrada VSV o un adsorbedor de membrana de intercambio de anión, (d) intercambiar el amortiguador y concentrar el VSV mediante

filtración de flujo tangencial (TFF) y (e) una filtración final del retenido VSV a través de un filtro de 0.2 a 0.22 micrómetros. Las etapas del proceso de purificación (a) a (e) anteriores se desarrollan a temperatura ambiente.

Procedimientos de clarificación

Clarificación primaria

También se describe en la Publicación de la Patente U.S. 2007/0249019 un método para clarificación primaria del fluido de cultivo celular para aislar y purificar el virus. Por ejemplo, el fluido de cultivo celular de un cultivo de célula de mamífero infectada con VSV se puede clarificar mediante certificación a baja velocidad (o alternativamente, mediante filtración de profundidad) y el VSV recuperado en el sobrenadante, también denominado aquí como "clarificación primaria" del fluido de cultivo celular. N ciertas modalidades, la clarificación primaria del fluido de cultivo celular se conduce a temperatura ambiente.

Los métodos de centrifugación y el equipo utilizado en la clarificación primaria del fluido de cultivo celular son bien conocidos por un experto en la técnica. Como se define aquí, centrifugación a "baja velocidad" es una velocidad de centrifugación en o por debajo de 10,000 rpm.

Como se estableció anteriormente, el fluido de cultivo celular de un cultivo de célula de mamífero infectado con VSV se puede clarificar alternativamente mediante la filtración de profundidad (es decir, en lugar de centrifugación de baja velocidad). La filtración de profundidad se puede utilizar cuando se omite la centrifugación a baja velocidad de la clarificación primaria de la etapa (a). La filtración de profundidad (en contraste con la filtración de superficie) generalmente se refiere a un filtro "grueso" que captura los contaminantes dentro de su estructura. Los materiales de filtración profunda y los métodos son bien conocidos por un experto en la técnica. por ejemplo, el material de filtro está típicamente compuesto de una estructura celulósica gruesa y fibrosa con ayudas de filtro inorgánico tal como partículas de tierra de diatomáceas incrustadas en las aberturas de las fibras. El material de filtro tiene un área de superficie interna grande, que es la clave para la captura de partícula y la capacidad del filtro. Tales módulos de filtración profunda contienen poros desde 1.0 micrómetros a 4.5 micrómetros. Módulos de filtración de profundidad de ejemplo incluyen, pero no

están limitados a, Whatman® Polycap™. Los módulos HD (Whatman Inc; Florham Park, N.J.), los módulos Sartorius Sartoclear™ P (Sartius Corp.; Edgewood, N.Y.) y los módulos Millipore® Millistak+.® HC (Millipore; Billerica, Mass.). El fluido del cultivo celular se puede clarificar por vía de la filtración de profundidad (desarrollada a temperatura ambiente) y el VSV se recupera en el filtrado.

Clarificación secundaria

También como se describió en la Publicación de Patente U.S. 2007/0249019 está un método para la clarificación secundaria del fluido de cultivo celular para aislar y purificar el virus. Después de la clarificación primaria por vía de la centrifugación (o la filtración de profundidad), el sobrenadante VSV (o el filtrado) clarifica adicionalmente mediante filtración o micro filtración a través de un filtro de 0.2 a 0.25 micrómetros y la recuperación del VSV en la solución filtrada. La micro filtración se puede desarrollar a temperatura ambiente, como se definió anteriormente. Los medios de filtración/micro filtración están disponibles en una amplia variedad de materiales y métodos de elaboración, que son conocidos por un experto en la técnica. Las unidades de filtro de micro filtración de ejemplo incluyen, pero no están limitadas a, las unidades de filtro Millipore Millex.®.-GV (Millipore; Billerica, Mass.), unidades de filtro Millipore Millex.®-GP, unidades de filtro Pall Supor® (Pall Corp.; East Hills, N.Y.), las unidades de filtro Sartorius Sartobran™ (Sartorius Corp.; Edgewood, N.Y.) y 2 unidades de filtro Sartorius Sartopore™. En ciertas modalidades, estas unidades de filtración poseen filtros de un tamaño entre 0.2 a 0.45 micrómetros. El VSV filtrado se recupera en la primera solución.

Adsorción de la membrana de intercambio aniónico

Una vez que el VSV se ha recuperado después de clarificación, el VSV puede ser adicionalmente purificado sobre un adsorbedor de la membrana de intercambio aniónico. Los materiales adsorbedores de la membrana son bien conocidos por un experto en la técnica y están disponibles para los vendedores como tal Sartorius Corp. (Edgewood, N.Y.), Pall Corp. (East Hills, N.Y.) y Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Mo.). Los adsorbedores de la membrana de intercambio aniónica de ejemplo incluyen, pero no están limitados a un adsorbedor de membrana Q Sartobind™ (Sartorius Corp.) y un adsorbedor de membrana Mustang™ Q (Pall Corp.). en una modalidad, el adsorbedor con la membrana de intercambio aniónica es un

adsorbedor de membrana Pall Mustang™ Q. en general, los métodos y amortiguadores conocidos de la cromatografía de intercambio de ion convencional se pueden aplicar directamente a la cromatografía adsorbedora de membrana, las células son conocidas por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, la cromatografía del adsorbedor de membrana de intercambio de anión, se desarrolla a temperatura ambiente, como se definió anteriormente.

Así, el VSV se puede purificar por vía de un adsorbedor de membrana de intercambio aniónica, en donde la solución filtrada VSV de la clarificación secundaria se carga al adsorbedor de membrana de intercambio aniónico equilibrada con una solución de sal amortiguada con pH (también denominada como un "amortiguador de equilibrio" o "amortiguador de unión" VSV). El VSV se eluye del adsorbedor de membrana de intercambio aniónico con una segunda solución de sal amortiguada con pH ("el amortiguador de elución") y se recuperan las fracciones VSV eluidas (por ejemplo ver Publicación de Patente U.S. 2007/0249019).

La primera solución de sal amortiguada con pH y el amortiguador de equilibrio puede ser una solución de sal de NaCl o KCl. El NaCl o KCl puede está presente en la solución con una concentración iónica entre aproximadamente por lo menos 0.1 M a aproximadamente 0.4 M, que incluye concentraciones iónicas de fracción entre estas. La solución amortiguadora puede ser un amortiguador de fosfato, un amortiguador de ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfonica (HEPES) o un amotiguador Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). Estos amortiguadores pueden tener un pH entre aproximadamente 6.0 a aproximadamente 8.0.

El amortiguador de equilibrio puede además comprender aproximadamente 1% de sacarosa a aproximadamente 5% de sacarosa. La segunda solución de sal amortiguada con pH (el "amortiguador de elución") también puede comprender los mismos componentes de amortiguamiento como el primer amortiguador (equilibrio). El amortiguador de elusión puede además comprender aproximadamente 1% de sacarosa a aproximadamente 5% de sacarosa.

Para eluir el VSV de la membrana, la concentración de sal (NaCl o KCl) (concentración iónica) del amortiguador de elución se puede incrementar mediante un gradiente lineal o en un proceso de elusión de etapa única (también descrito en la Publicación de Patente U.S. 2007/0249019). Ambas etapas son igualmente efectivas

al eluir el VSV del adsorbedor de membrana de intercambio aniónico. La concentración iónica del NaCl en la segunda solución de sal amortiguada con pH debe estar entre 0.5 M a 0.75 M.

La concentración iónica del NaCl en la segunda solución de sal amortiguada con pH se debe incrementar linealmente desde 0.001 M a 0.75 M a una tasa de flujo de elusión de aproximadamente 10 CV/minuto a 30 CV/minuto.

Filtración de flujo tangencial (TFF)

Luego de la purificación VSV mediante la cromatografía del adsorbedor de membrana de intercambio, el VSV puede además ser purificado mediante filtración de flujo tangencial (TFF). En general, el TFF es un proceso impulsado por presión que utiliza una membrana (s) para separar los componentes en una solución liquida (o suspensión), en donde un fluido (el flujo de alimentación) se bombea tangencialmente a lo largo de la superficie de la membrana y una presión aplicada sirve para forzar una "porción" del fluido a través de la membrana al lado filtrado (de la membrana). El TFF se puede desarrollar a temperatura ambiente. En este proceso, el amortiguador se intercambia y el VSV se concentra. La etapa TFF puede comprender concentrar el VSV recuperado de la etapa de adsorción de membrana de intercambio aniónico por lo menos 5 minutos, seguido por al menos un intercambio de amortiguador.

Los materiales TFF (por ejemplo fibra hueca, enrollado en espiral, plata plana) y los métodos (por ejemplo ultra filtración (UF), diafiltración (DF), micro filtración) son bien conocidos por un experto en la técnica. La membrana TFF puede tener un corto de peso molecular de 300 a 750 kDa.

El amortiguador utilizado en el intercambio de amortiguador del TFF puede ser un amortiguador de fosfato, el amortiguador HEPES o el amortiguador TRIS como se describió anteriormente. Sin embargo el amortiguador puede tener una concentración de aproximadamente 5 mM a 15 mM, incluyendo concentraciones mM entre estas. El amortiguador de intercambio de amortiguador también puede comprender además 0.10 M a 0.20 M de NaCl y 3.5% a 4.5% de sacarosa.

271

Las fracciones VSV de la purificaron del adsorbedor de la membrana de intercambio aniónico puede ser agrupado, y la solución agrupada concentrada y el amortiguador intercambiado mediante TFF utilizando un cartucho de membrana TFF de fibra hueca con un corte de peso molecular de aproximadamente 750 kDa (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.; Piscataway, N.J.).

Filtración

En el método descrito en la Publicación de Patente U.S. 2007/0249019, la última etapa del proceso en la purificación del virus es la micro filtración final del retenido VSV del TFF, en donde el retenido se filtra a través de un micro filtro de 0.2 a 0.25 micrómetros, como se describió anteriormente para la clasificación secundaria por vía de micro filtración.

Virus de la estomatitis vesicular recombinante o genéticamente modificada (VSV)

El VSV, como se describió aquí, se puede obtener y purificar de un cultivo de célula de mamífero al emplear cualquiera de los métodos de purificación descritos anteriormente. Por "pureza mejorada" se entiende que el VSV purificado es por lo menos 90.0% libre de proteína de cultivo celular y los contaminantes de ácido nucleico y preferiblemente 99.0% a 99.8% libres de proteína de cultivo celular y de contaminantes de ácido nucleico.

En las modalidades particulares, el VSV purificado del fluido de cultivo celular de un cultivo celular de mamífero por cualquiera de los procesos descritos anteriormente es un VSV recombinante o genéticamente modificado y/o atenuado. Los métodos para producir virus ARN recombinantes, tales como VSV, son bien conocidos y denominados en la técnica como métodos de "rescate" o "genética inversa". Los métodos de rescate de ejemplo para el VSV incluyen, pero no están limitados a, los métodos descritos en la Patente U.S. No. 6,033,886 y en la Patente U.S. No. 6,168,943, incorporada cada una aquí como referencia. Las técnicas adicionales para conducir los rescates de los virus, tales como el VSV, se describen en la Patente U.S. No. 6,673,572 y WO 2004/113517, que se incorporan aquí como referencia.

El VSV puede ser un VSV de un serotipo específico en ciertas modalidades, el VSV purificado es un serotipo Indiana, un serotipo New Jersey, un serotipo Isfahan, serotipo Chandipura, u otros vesiculovirus. En ciertas modalidades el VSV puede contener secuencias de más de uno de tales serotipos.

Los vectores VSV (y las composiciones inmunogénicas de este) comprenden a menudo una o más mutaciones atenuantes dentro del genoma VSV. En ciertas modalidades, el VSV purificado tiene l secuencia genómica que comprende por lo menos una mutación, que atenúa la patogenia del VSV. En otras modalidades, el VSV purificado tiene una secuencia genómica que comprende por lo menos dos mutaciones, que atenúan la patogenia del VSV. Por ejemplo, un VSV atenuado puede comprender dos o más mutaciones atenuantes conocidas, tal como las mutaciones atenuantes establecidas en la Solicitud Internacional No. PCT/US2005/011499 (Publicación internacional No. WO 2005/098009), y el numero de Publicación de Patente 2007/0218078A1, incorporada aquí como referencia. Por ejemplo, las mutaciones atenuantes VSV conocidas incluyen, pero no están limitadas a, las mutaciones de mezcla de gen (que incluyen mezclas de gen de los genes VSV que firman el genoma VSV y designadas N, P, M, G y L), las mutaciones insercionales de proteína G, las mutaciones de truncamiento de proteína G, las mutaciones sensibles a temperatura (ts) (y otras mutaciones puntuales), mutaciones del gen M no citopáticas, mutaciones de madre G, mutaciones de ARN ambisentido y mutaciones de supresión de gen, cada una de las cuales se establece en detalle en la Publicación Internacional No. WO 2005/098009. Así, en ciertas modalidades, el VSV purificado comprende una o más mutaciones atenuantes, que incluyen, sin limitación, una mutación sensible a la temperatura (ts), una mutación puntual, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre G, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncada, una mutación de infección del gen G y una mutación de supresión de gen.

En ciertas modalidades, el VSV purificado mediante cualquiera de los procesos de purificación descritos anteriormente tienen más mutaciones que dan como resultado la atenuación del virus, y una o más mutaciones que resulten en el crecimiento creciente y e el rendimiento creciente del virus proveniente de las células de mamífero o de líneas celulares. Por ejemplo, la presente invención suministra un proceso o un método para la adaptación de un recombinante VSV altamente atenuado a las condiciones de cultivo de tejido al pasar de manera continua a baja

multiplicidad de infección (MOI) en las células Vero o en cualquier sustrato de células susceptible. El proceso de paso e serie múltiple da como resultado los cambios genotípicos caracterizados por el acrecentamiento progresivo de un número de sustituciones de nucleótido (NT) a través del genoma vírico. La mayoría de estas sustituciones de nucleótido dan como resultado las sustituciones del aminoácido (AA) en las proteínas VSV. El proceso descrito aquí dio como resultado la adaptación genotípica del virus, acompañada por las mejoras sustanciales del rendimiento del virus. El paso de las células Vero continuó hasta que se logro la estabilidad genotípica y fenotípica, usualmente en 10 a 15 pasadas en serie (P10 - P15). El paso adicional de los virus más allá del P15 mostró poco o ninguna sustitución adicional y no dio como resultado el mejoramiento adicional del rendimiento del virus. Este proceso dio como resultado la mejora sustancial en el rendimiento de elaboración así como también la consistencia de elaboración mejorada. Las mutaciones adaptativas no afectan sustancialmente la neurovirulencia (NV) del virus pasado cuando se probo en un modelo animal NV intracraneano de ratón altamente sensible.

Una modalidad de la invención suministra un virus de la estomatitis vesicular científicamente modificado, aislado (VSV) que tiene por lo menos una mutación de amino ácido en una región que corresponde a por lo menos una de las siguientes posiciones:

Los aminoácidos en las posiciones 119 o 142 de la proteína M;

Los aminoácidos en las posiciones 109, 224, 438, 477 o 481 de la proteína G; y

Los aminoácidos en las posiciones 205, 220 o 1450 de la proteína L.

En ciertas modalidades, la mutación está en cualquier posición 119 o 142 de la proteína M o en ambas posiciones 119 y 142 de la proteína M. En otras ciertas modalidades, la mutación del aminoácido en la posición 119 de la proteína M es una mutación T → N y la mutación del aminoácido en la posición 142 de la proteína M es una mutación P → T o una mutación P → Q.

En una modalidad, la mutación de los aminoácidos en la posición 109, 224, 438, 477 o 481 de la proteína G es una mutación K → N, N → T, S → I, A → V/G → L o V → I, respectivamente.

En una modalidad, la mutación del aminoácido en la posición 205, 220, o 1450 de la proteína L es P → L, K → E, o L → I, respectivamente.

En ciertas modalidades, el VSV genéticamente modificado y atenuado como se describió aquí tienen una secuencia genómica que comprende una o más secuencias de polinucleótidos extrañas o heterólogas (o extrañas), tal como la estructura de lectura abierta ARN de extraña (ORF). Las secuencias de polinucleótido heterólogas pueden variar según se desee, e incluyen, pero no están limitadas a, un gen que codifica una citoquina (tal como una interleuquina), un gen que codifica un epítopo ayudante T, un gen que codifica un epítopo CTL, un gen que codifica un ayudante y un gen que codifica un co-factor, un gen que codifica un marcador de restricción, un gen que codifica una proteína terapéutica o una proteína de un diferente patógeno microbiano (por ejemplo, virus, bacteria, parásito u hongo), especialmente proteínas capaces de provocar respuestas inmunes deseables. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido heterólogas que codifican una proteína de un diferente patógeno microbiano puede ser una de un gen de VIH, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus de Varicela-Zoster, un gen del virus de paperas, un gen del virus de sarampión, un gen del virus de influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togvirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marbug, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus polioma, un gen del metapneumovirus, un gen de coronavirus, un gen de Vibrio colera, un gen del Streptococcus pneumoniae, un gen de Sterptococcus pyogenes, un gen de Helicobacter pylori, un gen de Sterptococcus agalactiae, un gen de Neisseria meningitidis, un gen de Neisseria gonorrea, un gen de Corynebacterium diphteria, un gen de Clostridum tetani, un gen de Bordetella pertussis, un gen de Haemophilus, un gen de Clamidia y u gen de Escherichia coli. En ciertas modalidades, el VSV purificado comprende un gen de la secuencia VIH, en donde la secuencia VIH se selecciona del grupo que consiste de gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev, o vpu. En una modalidad especifica, el gen VIH es gag o env.

275

En ciertas otras modalidades, el VSV purificado contiene por lo menos ambos una mutación atenuante y por lo menos una proteína heteróloga como se describió anteriormente. En otras ciertas modalidades, la composición inmunogénica VSV es un VSV genéticamente modificado que comprende dos mutaciones atenuantes y un orf que codifica la proteína VIH-1 gag. En una modalidad, el VSV genéticamente modificado comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína VIH gag, en donde la proteína VIH gag tiene una mutación en por lo menos uno de los aminoácidos en la posición 165, 270, 329 o 348, en donde la mutación es S → G, L → S, D → N o T → K, respectivamente.

En otras modalidades, el VSV genéticamente modificado descrito aquí codifica el gen VIH gag, en donde el gen gag se inserta en el genoma VSV en la posición uno (3'-gag_1-NPMGL-5'), la posición dos (3'-N-gag_2-PMGL-5'), la posición tres (3'-NP-gag_3-MGL-5'), la posición cuatro (3'-NPM-gag_4-GL-5'), la posición cinco (3'-NPMG-gag_5-L-5') o la posición seis (3'-NPMGL-gag_6-5'). En otras modalidades, el VSV descrito aquí codifica el gen VIH env, en donde el gen env se inserta en el genoma VSV en la posición uno (3'-env_1-NPMGL-5'), la posición dos (3'-N-env_2-PMGL-5'), la posición tres (3'-NP-env_3-MGL-5'), la posición cuatro (3'-NPM-env_4-GL-5'), la posición cinco (3'-NPMG-env_5-L-5') o la posición seis (3'-NPMGL-env_6-5').

Un experto en la técnica entendería de la descripción anterior que una variedad de modificaciones genéticas en el genoma VSV ocurrieron durante el paso en serie del virus a un MOI bajo en el cultivo de célula. Estas modificaciones genéticas tienen como resultado un incremento en el rendimiento vírico de las células infectadas. Más aun, no hubo otros cambios genotípicos o fenotípicos al virus y ninguna alteración en la atenuación del virus. Estas modificaciones genéticas probaron ser d beneficio significativo en términos de incrementar el rendimiento vírico a un nivel útil para el escalamiento en la producción del vector vírico.

La invención descrita aquí maneja la necesidad en la técnica de vectores del virus de la estomatitis vesicular (VSV) que tengan una patogenia significativamente atenuada en los mamíferos, particularmente patogenia atenuada como se revela en los modelos de neurovirulencia animal. Como se describió anteriormente el VSV tiene muchas características, que la hacen un vector adecuado para las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, la infección VSV de humanos no es común y es

asintomático o se caracteriza por síntomas medios similares a la gripa, que se resuelven en tres a ocho días sin complicaciones, y como tal, el VSV no se considera un patógeno humano. Otras características del VSV que lo hacen un vector atractivo incluyen: (a) la capacidad de replicar de manera robusta en el cultivo celular; (b) la incapacidad de integrarse a un ADN de las célula huésped y sufrir de recombinación genética; (c) la existencia de múltiples serotipos, que permiten la posibilidad de estrategias de inmunización de primer refuerzo; (d) los genes extraños de interés se pueden insertar en el genoma VSV y se expresan abundantemente en la transcriptasa vírica; (e) el desarrollo de un sistema altamente especializado para el rescate del virus infeccioso proveniente de la copia del cADN del virus del genoma (Patente U.S. 6,033,886; Patente U.S. 6,168,943) y (f) la inmunidad preexistente en el VSV es en la población humana poco frecuente.

Virus de la estomatitis vesicular atenuada

En ciertas modalidades, el VSV atenuado para uso en la presente invención comprende una o más mutaciones de las clases de mutaciones listadas adelante. Más aún, estos virus atenuados son modificados adicionalmente genéticamente utilizando los métodos de la presente invención, por ejemplo, el paso en serie durante aproximadamente 5 a 15 minutos utilizando un MOI bajo. Este método da como resultado la retención del genotipo atenuado y el fenotipo suministra modificaciones genéticas adicionales como se describen aquí, que resultan en una VSV que está mejor adaptada para crecer en el cultivo celular. Los rendimientos superiores de virus logrados mediante el uso de estos virus los hacen un candidato excelente para la producción de vectores.

A. Clases de mutación del virus de la estomatitis vesicular

En una modalidad, un vector VSV genéticamente modificado de la invención comprende por lo menos dos diferentes clases de mutaciones en su genoma. Como se anoto previamente, los términos "clase de mutación", "clases de mutación", o "clases de mutación" se utilizan intercambiablemente, y se refieren a las mutaciones conocidas en la técnica, cuando se usan de manera simple, para atenuar el VSV. Por ejemplo, una "clase de mutación" de la invención incluye, pero no está limitada a, una mutación del gen N sensible a temperatura VSV (en lo sucesivo "$N_{(ts)}$"), una mutación del gen L sensible a temperatura (en lo sucesivo, "$L_{(ts)}$"), una mutación puntual, una

mutación madre G (en lo sucesivo "$G_{(stem)}$"), una mutación del gen M no citopático (en lo sucesivo "$M_{(ncp)}$"), una mezcla gen o mutación de re arreglo, una mutación de gen G truncado (en lo sucesivo "$G_{(ct)}$"), una mutación de ARN ambisentido, una mutación de inserción del gen G, una mutación de supresión del gen y similares. Como se define posteriormente, una "mutación" incluye mutaciones conocidas en la técnica como inserciones, supresiones, sustituciones, re arreglos de gen o modificaciones de mezcla.

Adicionalmente, como se noto previamente, el termino atenuación "sinérgica" se refiere a un nivel de atenuación VSV, que es mayor que el aditivo. Por ejemplo, una atenuación sinérgica del VSV comprende combinar por lo menos dos clases de mutación en el mismo genoma VSV, dando como resultado de esta manera una reacción de la patogenia del VSV mucho mayor que un nivel de atenuación aditivo observado para cada clase de mutación VSV sola. Así, entre otras modalidades una atenuación sinérgica del VSV se define como el LD_{50} por lo menos mayor que el nivel de atenuación aditivo observado para cada clase de mutación sola (es decir la suma de las dos clases de mutación), en donde los niveles de atenuación (es decir el LD_{50}) se determinan en un modelo de neurovirulencia animal pequeño.

Por vía de ejemplo no limitante, si la ecuación (1) describe una "atenuación aditiva" del VSV:

$$(1) \qquad \Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50} = X_{LD50};$$

en donde Δa_{LD50} es LD_{50} de VSV que tiene una primera clase de mutación en su genoma, Δb_{LD50} es el LD_{50} del VSV que tiene una segunda clase de mutación en su genoma y X_{LD50} es la suma del Δa_{LD50} y el Δb_{LD50}; entonces la "atenuación sinérgica" VSV de la invención, que tiene un LD_{50} por lo menos mayor que el nivel de atenuación aditivo observado para cada clase de mutación sola, se describe en la ecuación (2):

$$(2) \qquad \Delta a,b_{LD50} > (\Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50});$$

en donde $\Delta a,b_{LD50}$ es LD_{50} del VSV que tiene una combinación de dos clases de mutaciones en su genoma, Δa_{LD50} es el LD_{50} de un VSV que tiene una primera clase de mutación en su genoma y Δb_{LD50} es el LD_{50} de un VSV que tiene una

segunda clase de mutación en su genoma. Así, en ciertas modalidades, la sinergia de la atenuación VSV (es decir dos clases de mutación en el mismo genoma VSV) se describe con relación al LD_{50} de dos construcciones VSV (cada construcción VSV tiene una clase de mutación única en sus genomas), en donde la atenuación sinérgica del VSV que tiene dos clases de mutación en sus genomas se define como el LD_{50} por lo menos mayor que el LD_{50} aditivo de las dos construcciones VSV que tienen una clase de mutación única en su genoma.

En ciertas otras modalidades, la sinergia de la atenuación VSV se describe con relación al LD_{50} del VSV tipo silvestre. Asi, en una modalidad, la atenuación sinérgica del VSV se define como el LD_{50} que es por lo menos mayor que el LD_{50} VSV de tipo silvestre, en donde el LD_{50} se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En una modalidad, la atenuación sinérgica del VSV se define como un LD_{50} que es por lo menos 10 veces mayor que el LD_{50} del VSV tipo silvestre, en donde el LD_{50} se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En otra modalidad, una alteración sinérgica del VSV se define como el LD_{50} que es por lo menos 100 veces mayor que le LD_{50} del VSV tipo silvestre, en donde el LD_{50} se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En otra modalidad, una atenuación sinérgica del VSV se define como el LD_{50} que es por lo menos 1,000 veces mayor que el LD_{50} del VSV tipo silvestre, en donde el LD_{50} se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En aun otras modalidades, la atenuación sinérgica del VSV se define como el LD_{50} que es por lo menos 10,000 veces mayor que el LD_{50} del VSV de tipo silvestre, en donde el LD_{50} se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En ciertas otras modalidades, una atenuación sinérgica del VSV se define como el LD_{50} que es por lo menos 100,000 veces mayor que el LD_{50} del VSV tipo silvestre, en donde el LD_{50} se determina en un modelo de neurovirulencia animal. La determinación de la dosis leal del 50% (LD_{50}) para un vector VSV particular se determina fácilmente por una persona experta en la técnica utilizando los métodos de prueba conocidos en modelos animales.

Mutaciones con mezcla de gen

En ciertas modalidades, el VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación de mezcla genética en su genoma. Como se definió aquí, los términos "mezcla de gen", "gen mezclado", "mezclado", "mezclar", "redisposición de gen" y "transposición de gen" se utilizan intercambiablemente, y se refieren a un

cambio (mutación) en el orden del genoma VSV tipo silvestre. Como se definió aquí, el genoma VSV tipo silvestre tiene el siguiente orden de gen: 3'-NPMGL-5'.

Se conoce en la técnica, que la posición de un gen VSV relativo al promotor 3' determina el nivel de expresión y la atenuación del virus (Patente U.S. 6,596,529 y Wertz *et al.*, 1998, cada uno incorporado específicamente aquí como referencia). Existe un gradiente de expresión, con genes próximos al promotor 3' expresados más abundantemente que los genes distantes al promotor 3'. Las secuencias de nucleótido que codifican las proteínas G, M, N, P y L del VSV son conocidas en la técnica (Rose and Gallione, 1981; Gallione *et al.*, 1981). Por ejemplo, la Patente U.S. 6,596,529 describe mutación de mezcla de gen en el cual el gen para la proteína N se transpone (mezcla) a partir de la primer posición próxima al promotor tipo silvestre a posiciones sucesivamente más distantes del genoma, con el fin de reducirse exitosamente la expresión de la proteína N (por ejemplo, 3'-PNMGL-5', 3'PMNGL-5', 3'-PMGNL-5', denominada como N2, N3, y N4, respectivamente). Así, en ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado comprende una mutación de mezcla de gen en su genoma. En una clase de mutación, en una modalidad particular, un VSV genéticamente modificado comprende una mutación de mezcla de gen que comprende una transposición del gen N (por ejemplo, 3'-PNMGL-5' o 3'PMNGL-5').

Se debe notar aquí, que la inserción de una secuencia de ácido nucleico extraña (por ejemplo, VIH *gag*) en el genoma VSV 3' a cualquiera de los genes N, P, M, G o L, resulta efectivamente en una "mutación de mezcla de gen" como se definió anteriormente.

Por ejemplo, cuando el gen VIH *gag* se inserta en el genoma VSV en la posición uno (por ejemplo, 3'-gag_1-NPMGL-5'), los genes N, P, M, G y L se mueven cada uno desde sus posiciones tipo silvestre posiciones más distantes en el genoma. Así, en ciertas modalidades de l invención, una mutación de mezcla de gen incluye la inserción de una secuencia de ácido nucleico extraña en el genoma VSV 3' a cualquiera de los genes N, P, M, G o L (3'-gag_1-NPMGL-5', 3'-N-gag_2-PMGL-5', 3'-NP-gag_3-MGL-5', etc.)

Inserción de la proteína G y mutantes de truncamiento

En ciertas otras modalidades, el VSV genéticamente modificado de la invención comprende un gen G mutado, en donde la proteína G codificada se trunca en su dominio citoplasmático (carboxiterminal), también denominada como "región de cola citoplasmática" de la proteína G. se conoce en la técnica que las mutaciones del gen G que truncan el carboxiterminal del dominio citoplasmático influencian del florecimiento VSV de la influencia del dominio citoplasmático y la producción de virus atenuado (Schnell, et al. The EMBO Journal 17(5):1289-1296, 1998; Roberts, et al. J Virol, 73:3723-3732, 1999). El dominio citoplasmático de la proteína G del VSV tipo silvestre comprende veintinueve aminoácidos (RVGIHLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK-COOH; SQ ID NO:1).

En ciertas modalidades, un gen de VSV G truncado en la invención codifica una proteína G en la cual los últimos veintiocho residuos del aminoácido carboxiterminal del dominio citoplasmático se suprimen (reteniendo solamente la arginina del dominio citoplasmático tipo silvestre con veintinueve aminoácidos de la SEQ ID NO:1). En ciertas otras modalidades, un gen de VSV G truncado de la invención codifica una proteína G de la cual los últimos veinte residuos de aminoácido carboxiterminal del dominio citoplasmático se suprimen (con relación al dominio citoplasmático tipo silvestre con veintinueve aminoácidos de la SEQ ID NO:1).

En ciertas otras modalidades, un gen VSV G truncado de la invención codifica una proteína G que comprende un aminoácido único en su dominio citoplasmático (región de cola citoplasmática), en donde el aminoácido único es cualquier aminoácido de ocurrencia natural. En aun otras modalidades, el gen VSV G truncado de la invención codifica una proteína G que comprende nueve aminoácidos en su dominio citoplasmático (región de cola citoplasmática), en donde los nueve aminoácidos son aminoácidos de ocurrencia natural. En ciertas otras modalidades, el gen VSV mutado de la invención codifica una proteína G que contiene una inserción que representa un epítopo de extraño. Tales mutantes son conocidos en la técnica (por ejemplo ver Schlehuber and Rose, 2003).

Como se definió aquí, el mutante del gen G que codifica una proteína G en la cual por lo menos veintiocho residuos de amino ácido carboxiterminal del dominio citoplasmático se suprimen, con relación a la secuencia de tipo silvestre de la SEQ ID NO:1, se designan "$G_{(ct-1)}$", o simplemente como "CT1", en donde el dominio

citoplasmático del $G_{(ct-1)}$ tiene una secuencia de aminoácido de (R-COOH). Como se definió aquí, un mutante del gen G que codifica una proteína G en la cual los últimos veinte residuos de aminoácido carboxiterminal del dominio citoplasmático se suprimen, con relación a la secuencia tipo silvestre de la SEQ ID NO:1, se designa "$G_{(ct-9)}$", en donde el dominio citoplasmático del $G_{(ct-9)}$, o simplemente el "CT9", tiene una secuencia de aminoácido del (RVGIHLCIK-COOH; SEQ ID NO:2). Así, en ciertas modalidades de la invención, el VSV genéticamente modificado de la invención comprende un gen G mutado, en donde la proteína G es una $G_{(ct-1)}$ o $G_{(ct-9)}$.

Temperatura sensible y otras mutaciones puntuales

La mutación "sensible a temperatura" VSV ("ts"), como se definió aquí, es una mutación en el genoma VSV que restringe el crecimiento VSV a una temperatura no permisiva, por ejemplo, un mutante VSV ts en la invención crece normalmente y con un titulo alto a la temperatura permisiva (por ejemplo 31°C), pero su crecimiento o producción está restringido a temperaturas no permisivas (por ejemplo 37°C o 39°C). la generación de los mutantes ts por la mutagenia dirigida química y de sitio son bien conocidos en la técnica (por ejemplo ver Pringle, 1970; Li *et al.*, 1988); y numerosos mutantes ts se han caracterizado y descrito (por ejemplo; ver Flamand and Pringle, 1971; Flamand and Bishop, 1973; Printz and Wagner, 1971; Gopalakrishna and Lenard, 1985; Pringle *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1988; Rabinowitz *et al.*, 1977; Lundh *et al.*, 1988; Dal Canto *et al.*, 1976; Rabinowitz *et al.*, 1976). En ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación ts en su genoma, en donde la mutación ts es una o más mutaciones de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G, M, N, P o L.

Como se definió aquí una mutación ts de una cualquiera de los genes G, M, N, P o L del VSV es una "clase de mutación" separada de la invención. Por ejemplo, en ciertas modalidades de la invención, el VSV genéticamente modificado que comprende por lo menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma (en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenia del VSV) comprenden una o más mutación (es) del gen N (en lo sucesivo, "$N_{(ts)}$") como una primera clase de mutación y una o más mutación (es) del gen ts L (en lo sucesivo, "$L_{(ts)}$") como una segunda clase de mutación. Como un ejemplo no limitante, un VSV genéticamente modificado que comprende un genoma tal como 3'-$N_{(ts)}$PMG$L_{(ts)}$-5' comprende dos clases de mutaciones (es decir, (1) una mutación del gen $N_{(ts)}$ y (2)

una mutación del gen $L_{(ts)}$) y un VSV genéticamente modificado que comprende un genoma tal como 3'-gag_1-$N_{(ts)}$PMG$L_{(ts)}$-5' comprende tres clases de mutaciones (es decir (1) una mutación del gen $N_{(ts)}$, (2) una mutación del gen $L_{(ts)}$ y (3) por vía de inserción de gag_1, una mutación de mezcla del gen).

Excepto en otras modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación puntual en su genoma, en donde la mutación puntual en una o más mutaciones de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G, M, N, P o L, en donde la mutación le confiere un genotipo atenuante tal como una adaptación al frío, una fusión disminuida a una deficiencia citopatogénica (por ejemplo ver Fredericksen y Whitt, 1998; Ahmed y Lyles, 1997). Por ejemplo, Federicksen y Whitt (1998) describe tres mutaciones puntuales atenuantes del gen G (por ejemplo, D137-L, E139-L o DE-SS) que tienen un umbral de pH cambiado por una actividad de fusión. Ahmed y Lyles (1997) describen una mutación puntual atenuante del gen M (N163D) que fue altamente defectuosa en la inhibición del gen huésped y cambio más rápidamente que la proteína M tipo silvestre. Así, en ciertas modalidades, el VSV genéticamente modificado de la invención comprende una o más mutaciones puntuales en su genoma.

Mutaciones del gen M no citopáticas

En ciertas otras modalidades, el VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M. el gen M del VSV (serotipo Indiana) codifica una proteína M de 229 aminoácidos (matriz), en donde los primeros treinta aminoácidos del terminal NH_2 comprenden un motivo PPPY. Se demostró por Jayakar *et al.* (J. Virology, 74: 9818-27, (2000)), que las mutaciones en el motivo PPPY (por ejemplo, APPY, AAPY, PPAY, APPA, AAPA y PPPA) reducen el rendimiento del virus al bloquear una etapa tardía en la floración del virus. Así, en ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M, en donde la mutación está en el motivo PPPY de la proteína M codificada.

Se ha reportado recientemente que el mARN M codifica adicionalmente dos proteínas adicionales, denominadas como M2 y M3 (Jayakar y Whitt, J. Virology, 76:8011-18, 2002). Las proteínas M2 y M3 se sintetizan de metioninas corriente abajo en la misma estructura de lectura que codifica la proteína M de 229 aminoácidos

(denominada como M1), y la falta de los primeros treinta y dos (proteína M2) o cincuenta (proteína M3) aminoácidos de la proteína M1. Se ha observado que las células infectadas con un VSV recombinante que expresa una proteína M, pero no M2 y M3, exhiben un inicio retrasado del efecto citopático (en ciertos tipos células), producen aun un rendimiento de virus normal. Así, en ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación citopática en el gen M, en donde la mutación del gen M da como resultado en un virus que no expresa la proteína M2 o M3 (por ejemplo ver Jayakar y Whitt, 2002).

Mutaciones del gen G

En ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención compren una mutación en el gen G, en donde la proteína G codificada tiene una mutación en la región madre próxima a la membrana del ectodominio de la proteína G, denominado como proteína madre G. la región madre G comprende los residuos de aminoácido 421 a 462 de la proteína G. recientes estudios han demostrado la atenuación VSV por vía de la inserción y/o supresión (ejemplo, truncamiento) mutaciones en la madre G de la proteína G (Robinson y Whitt, J. Virol., 74, 2239-46, 2000; Jeetendra *et al.*, J. Virol, 76, 12300-311, 2002; Jeetendra *et al.*, J. Virol, 77, 12807-18, 2003). Así, en ciertas modalidades, el VSV genéticamente modificado comprende una inserción en la madre G, supresión, sustitución o una combinaron de estos. En una modalidad particular, un vector VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación madre G (y una composición inmunogénica de esta), comprende un genoma de 3'-gag_1-$NPMG_{(stem)}$L-5'.

Mutaciones ARN ambisentido

En ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación ARN ambisentido, en la cual el promotor antigenoma 5'(AGP) se reemplaza con una copia del promotor de genoma 3' (GP). El AGP 5' del VSV, así como también otros virus de ARN de cadena negativa no segmentados, actúan como un promotor de replicación fuerte mientras que el 3' GP actúa como un promotor de transcripción y un promotor de replicación débil. En el cruce normal de la infección VSV, existe una predominancia de 3 a 4 veces de las copias del genoma sobre las copias del antigenoma; esta proporción es aun mayor para los virus de rabia, otro miembro de la familia Rhabdovirus (Finke y Conzelmann, J. Virology,

73(5):3818-25, 1999). El trabajo previo con los virus de rabia demostró que remplazar el 5' AGP con una copia del GP (conocida como mutación ARN ambisentido) conduce a niveles iguales de genoma y de copias de ARN antigenoma dentro de las células infectadas. Además, un gen externo se expreso de la copia del GP colocado en el extremo 5' del genoma. Cuando se pasan en serie los cultivos e las células cultivadas, los virus de la rabia que contienen la mutación ARN ambisentido replicaron consistentemente 10 a 15 veces menos títulos que un virus de la rabia tipo silvestre recombinante (Finke y Conzelman, J. Virology, 73(5):3818-25, 1999). Tal mutación se utiliza en los vectores VSV tanto para atenuar la replicación del virus como para expresar los genes extraños. Así, en ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado comprende una mutación ARN ambisentido.

Supresiones de gen

En ciertas otras modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende un virus en el cual el gen VSV (tal como G o M) se detectan del genoma. Por ejemplo, Roberts *et al.* (J. Virol., 73, 3723-32, 1999) describieron un vector de VSV en el cual el ge completo que codifica la proteína G se suprimió (ΔG) y sustituyo con la proteína de hemaglutinina de influenza (HA), en donde el vector VSV (ΔG-HA) demostró patogenia atenuada.

B. Métodos para generar las modificaciones genéticas adicionales del VSV atenuado

En ciertas modalidades, la invención se dirige a un VSV genéticamente modificado que comprende por lo menos dos diferentes clases de mutaciones establecidas adelante. Cualquiera de estos VSV genéticamente modificados y atenuados puede ser adicionalmente genéticamente modificado por los métodos descritos e la presente invención. Esto es, cualquiera de estos VSV atenuados pueden ser pasados en serie en células susceptibles o en líneas celulares de aproximadamente 5 a 15 veces a una multiplicidad baja de infección que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 PFU por célula y sus genomas analizados para la presencia de por lo menos una de las mutaciones descritas aquí.

De acuerdo con esto, en un aspecto de la invención, se suministra un método para adaptar un virus para crecer en un cultivo celular que comprende las siguientes etapas:

285

a) infectar el cultivo de célula con el virus a una baja multiplicidad de infección (MOI) que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU) por célula;

b) cosechar el medio de cultivo celular que contiene el virus;

c) verificar el medio de cultivo celular;

d) congelar el medio del cultivo celular;

e) repetir las etapas a) a d) durante aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces.

El uso de este método resulta en un incremento de 5 a 100 veces la producción/rendimiento del virus y un incremento en las características de estabilidad del genotipo y el fenotipo del virus, comparado con la producción o rendimiento del virus que utiliza el VSV que no se ha pasado a un MOI bajo durante aproximadamente 5 a 15 veces a un MOI bajo de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 PFU por célula.

El uso de tal método da como resultado un virus de la estomatitis vesicular genéticamente modificado (VSV) que tiene por lo menos una mutación de aminoácido en una región que corresponde a por lo menos una de las siguientes posiciones:

los aminoácidos en las posiciones 119 o 142 de la proteína M;

los aminoácidos en las posiciones 109, 224, 438, 477, o 481 de la proteína G; y

los aminoácidos en las posiciones 205, 220 o 1450 de la proteína L.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado producido mediante los métodos de la invención tiene una mutación que comprende un cambio de aminoácido conservador o no conservador.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado producido por los métodos de la invención tiene una mutación en su posición 119 o 142 de la proteína M o en ambas posiciones 119 y 142 de la proteína M. En una modalidad, la mutación del aminoácido en la posición 119 de la proteína M es una mutación T → N y la mutación del aminoácido en la posición 142 de la proteína M es una mutación P → T o una mutación P → Q.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado producido por los métodos de la invención tiene una mutación de los aminoácidos en la posición 109, 224, 438, 477 o 481 de la proteína G que es un K →N, N → T, S → I, A → V/G → L o V → I, respectivamente.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado producido por los métodos de la invención tiene una mutación del aminoácido en la posición 205, 220 o 1450 de la proteína L que es P → L, K → E, o L → I, respectivamente.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado producido por los métodos de la invención comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína VIH gag, en donde la proteína VIH gag tiene una mutación en por lo menos uno de los aminoácidos en la posición 165, 270, 329 o 348, en donde las mutaciones es S → G, L → S, D → N, o T → K, respectivamente.

En una modalidad, las mutaciones anotadas anteriormente en el VSV genéticamente modificado producido por los métodos de la invención dan como resultado una estabilidad creciente del genotipo y el fenotipo del virus y resultan además en un rendimiento reciente de la producción de virus proveniente de las células infectadas con el VSV genéticamente modificado.

En una modalidad, el VSV genéticamente modificado producido por los métodos de la invención comprende además por lo menos otras dos mutaciones en su genoma, seleccionada de cualquiera de aquellas descritas anteriormente. En una modalidad, las mutaciones se pueden seleccionar del grupo que consiste de una mutación sensible a la temperatura, o una mutación puntual, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre G, una mutación del gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción del gen G y una mutación de supresión de gen.

En una modalidad, los métodos descritos aquí utilizan un virus que es un virus atenuado. En una modalidad, los métodos para producir el virus genéticamente modificado se adaptan para producción a gran escala de un vector vírico o composición inmunogénica. En una modalidad, los métodos dan como resultado un rendimiento 5 a 100 veces mayor del virus comparado con aquel obtenido con la cepa del virus que no se ha pasado durante aproximadamente 5 a 15 veces a una baja multiplicidad de infección que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa por célula. En una modalidad, el método descrito anteriormente permite el mantenimiento del o las mutaciones pre existentes asociadas con la atenuación del virus. La o las mutaciones preexistentes asociadas con la atenuación del virus se pueden seleccionar de la mutación sensible a la temperatura, una mutación puntual, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre G, una mutación de M no citopática, una mutación ARN ambisentido, una mutación del gen G trucado, una mutación de inserción del gen G y una mutación de supresión de gen. En una modalidad, el método permite mantener un perfil de neurovirulencia bajo asociado con la atenuación del virus. En una modalidad, el virus atenuado en los métodos descritos anteriormente es una cepa de virus de estomatitis vesicular (VSV).

C. Vectores del virus de la estomatitis vesicular recombinante

En ciertas modalidades, la invención suministra un vector VSV recombinante que comprende por lo menos dos diferentes clases de mutaciones en su genoma y por lo menos una secuencia de ARN extraño insertada como una unidad transcripcional separada en o remplazando una región del genoma VSV no esencial para replicación. Este vector VSV recombinante puede ser adicionalmente genéticamente modificado para contener por lo menos una de las modificaciones descritas anteriormente, que den como resultado la adaptación del virus para crecerla en el cultivo celular, incrementando así el rendimiento del virus por célula.

Los métodos para producir el virus del ARN recombinante se prefieren en la técnica como métodos de "rescate" o "genética inversa". Los métodos de rescate de ejemplo para el VSV se describen en la Patente U.S. 6,033,886, la Patente U.S. 6,596,529 y la WO 2004/113517, incorporadas aquí cada una como referencia. La transcripción y replicación de los genomas de ARN vírico de codificación negativo, de

cadena única, no segmentados, se logran a través de la actividad enzimatica del complejo de proteína multimérico que actúa sobre el núcleo de ribonucleoproteína (nucleocápsido). El ARN genómico desnudo no puede servir como una plantilla. Por el contrario, estas secuencias genómicas se reconocen solamente cuando ellas son completamente encapsidadas por la proteína N en la estructura del nucleocápsido. Es solo en ese contexto que las secuencias promotoras terminales genómica y antigenómica se reconocen para iniciar las sendas transcripcionales o de replicación.

Un equivalente de ADN clonado del genoma VSV se coloca entre un promotor de ARN polimerasa dependiente de ADN (por ejemplo, el promotor de ARN polimerasa T7) y una secuencia de ribozima auto clivante (por ejemplo, la delta ribosima de la hepatitis), que se inserta en un vector de transcripción adecuado (por ejemplo un plásmido bacterial propagable). Este vector de transcripción suministra la plantilla de ADN fácilmente manipulable de la cual la ARN polimerasa (por ejemplo, la ARN polimerasa T7) pueden confiablemente transcribir una copia de ARN de cadena única del antigenoma VSV (o genoma) con los terminales precisos o aproximadamente precisos, 5' y 3'. La orientación de la copia del ADN genómico VSV y el promotor de flanqueo y las secuencias de ribozima determinan si los equivalentes del ARN antigenoma o genoma se transcriben. También se requiere para rescate de la nueva progenie VSV las proteínas de soporte trasactuantes especificas de VSV necesarias para encapsidar el antigenoma VSV de cadena única desnudo o los transcritos de ARN genómico en las plantillas de nucleocápsido funcionales: la proteína del nucleocápsido vírico (N), la fosfoproteína asociada polimerasa (P) y la proteína polimerasa (L). Estas proteínas comprenden la ARN polimerasa dependiente de ARN que debe acoplar la plantilla de nucleocápsido para elaborar las transcripciones de replicación.

Así, un VSV genéticamente modificado y atenuado de la invención que comprende por lo menos dos diferentes clases de mutación en su genoma (por ejemplo, ver sección A), se produce de acuerdo con los métodos de rescate conocidos en la técnica. por ejemplo, un vector VSV genéticamente modificado que comprende por lo menos dos diferentes clases de mutaciones en su genoma se genera utilizando (1) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislada la cual comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un genoma o antigenoma de un VSV y (2) por lo menos un vector de expresión que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico aislada que

codifica las proteínas N, P y L transactuantes necesarias para la encapsidación, transcripción y replicación; en una célula huésped bajo condiciones suficientes para permitir la co-expresión de estos vectores y la producción del VSV recombinante. Cualquier cepa o serotipo VSV adecuados se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, incluyendo, pero no estando limitados a VSV Indiana, VSV New Jersey, VSV Chandipura, VSV Glasgow, y similares.

Además de las secuencias de polinucleótido que codifican las formas atenuadas del VSV, la secuencia de polinucleótido también puede codificar una o más secuencias de polinucleótido heterólogas (o extrañas) o estructuras de lectura abierta (ORFs). Las secuencias de polinucleótido heterólogas pueden variar según se desee, e incluir, pero no están limitadas a, un cofactor, una citoquina (tal como una interleuquina), un epítopo ayudante T, un epítopo CTL, un marcador de restricción, un ayudante, o un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria, parásito u hongo), especialmente proteínas capaces de provocar respuestas inmunes deseables. En ciertas modalidades, un ORF heterólogo contiene un gen de VIH (por ejemplo, *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev o vpu*). En una modalidad particular, el gen del VIH es *gag*, en donde el gen *gag* se inserta en el genoma VSV en la posición uno (3'-gag_1-NPMLG-5') o en la posición cinco (3'-NPMG-gag_5-L-5'). En otra modalidad, la secuencia heteróloga del polinucleótido codifica además una citoquina, tal como la interleuquina-12, que se selecciona para mejorar las características profilácticas o terapéuticas del VSV recombinante.

En ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado y atenuado de la invención muta mediante medios convencionales, tal como mutagenia química. Por ejemplo, durante el crecimiento del virus en los cultivos celulares, se agrega un mutágeno químico, seguido por: (a) la selección del virus que se ha sometido al paso a temperatura subóptima con el fin de seleccionar las mutaciones sensibles a temperatura y/o adaptadas al frío, (b) identificación de los virus mutantes que producen placa pequeñas en el cultivo celular, (c) el paso a través de huéspedes heterólogos para seleccionar la mutaciones a rango de huésped. E otras modalidades, las mutaciones atenuantes comprenden elaborar mutaciones predeterminadas utilizando mutagenia dirigida de sitio y luego rescatar los virus que contienen estas mutaciones. Como se estableció previamente, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende por lo menos dos clases de mutación en su genoma. En ciertas modalidades, una o más clases de mutación

comprende además mutaciones múltiples, tales como la clase mutación de madre G que tiene una mutación doble (por ejemplo, una supresión, inserción, sustitución, etc.), una mutación triple y similar. Estos vectores VSV atenuados se seleccionan para la atenuación de su virulencia en el modelo animal.

La circunstancia típica (aunque no necesariamente exclusiva) para el rescate incluyen un medio de célula de mamífero apropiado en el cual se presenta la polimerasa T7 para manejar la transcripción del ARN de cadena única antigenómico (o genómico) del vector de transcripción que contiene el cADN genómico vírico. Co-transcripcionalmente o poco después, este transcripto de ARN de antigenoma vírico (o genoma) se encapsida en plantillas funcionales mediante proteína de nucleocápsido y se acopla mediante los componentes de polimerasa requeridos producidos concurrentemente de los plásmidos de expresión de co-transfectados que codifican las proteínas transactuantes especificas de virus requeridas. Estos eventos y procesos conducen a la transcripción pre requisito de los ARNm víricos, la replicación y amplificación de los nuevos genomas y, de esta manera la producción de la progenie VSV novedosa, es decir, rescate.

El vector de transcripción y el vector de expresión son típicamente vectores de plásmido designados para la expresión en la célula huésped. El vector de expresión que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas transactuantes necesarias para la encapsidación, transcripción y replicación expresan estas proteínas del mismo vector de expresión o por lo menos dos diferentes vectores. Estos vectores son generalmente conocidos de los métodos de rescate básicos, y no necesitan ser alterados para uso de los métodos mejorados de esta invención.

Las técnicas adicionales para conducir el rescate de virus tales como VSV, son transcritas en la Patente U.S. 6,673,572 y U.S. 6,673,572 y la Solicitud de Patente Publicada U.S. US20060153870, que se incorpora aquí como referencia.

Las células huéspedes utilizadas en el rescate del VSV son aquellas que permiten la expresión de los vectores de los constituyentes requisitos necesarios para la producción del VSV recombínate. Tales células huéspedes se pueden seleccionar de una célula procariótica o de una célula eucariótica, y preferiblemente una célula de vertebrado. En general, las células huéspedes se derivan de una célula humana, tal

como una célula de riñón embriónico humana (por ejemplo, 293). Las células Vero, así como también muchos otros tipos de células son también utilizadas como células huésped. Los siguientes son ejemplos no limitantes de células huéspedes adecuadas: (1) Líneas Celulares Primarias Diploides Humanas (por ejemplo, células WI-38 y MRC5); (2) Línea Celular Diploide de Mono (por ejemplo, células de Pulmón de Rhesus Fetal FRhL); (3) línea de célula continua cuasi primaria (por ejemplo, células de riñón de mono verde AGMK-Africano); (4) células 293 Humanas y (5) otras líneas celulares potenciales tales como, CHO, MDCK (Riñón Canino Madin-Darby), fibroblastos de embriones de pollo primario. En ciertas modalidades, un reactivo que facilita la transfección se agrega para implementar la toma de ADN por las células. Muchos de estos reactivos son conocidos en la técnica (por ejemplo, fosfato de calcio). Ejemplos comunes son Lipofectace (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y Effectene (Qiagen, Valencia, CA). El Lipofectace y el Effectene son ambos lípidos catiónicos. Ellos ambos recubren el ADN y mejoran la toma de ADN por las células. El Lipofectace forma un liposoma que circunda el ADN mientras que el Effectane recubre el ADN pero no forma un liposoma. Alternativamente, la toma de ADN de plásmido también se puede mejorar mediante la electroporación de las células, por medio de la cual se aplica una corriente de alto voltaje a través de una cubeta que contiene las células y el ADN durante milisegundos.

El VSV atenuado rescato es luego probado para su fenotipo deseado (sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, morfología de placa, y transcripción y atenuación de replicación), primero por unos medios *in vitro*. Las mutaciones también se prueban utilizando un sistema mini replicón donde la encapsidación transactuante requerida y las actividades de polimerasa se suministran por medio de los virus tipo silvestre modificados, o por plásmidos que expresan los genes N, P y el L diferente que albergan mutaciones atenuantes especificas del gen. El VSV atenuado es también probado *in vivo* para atenuación sinérgica en un modelo de neurovirulencia animal. Por ejemplo, los modelos de ratón y hurón se establecen para detectar neurovirulencia. En resumen, grupos de diez ratones se inyectaron intra cranealmente (IC) con cada uno de un rango de concentraciones de virus que abarcan la dosis LD_{50} anticipada (una dosis que es letal para el 50% de los animales). Por ejemplo, las inoculaciones IC con virus a 10^2, 10^3, 10^4 y 10^5 pfu se utilizan donde el LD_{50} anticipado para el virus está en el rango de 10^3-10^4 pfu. Las formulaciones de virus se preparan mediante dilución en serie de los almacenamientos de virus purificados en PBS. Los ratones son entonces inyectados a través de la parte

superior del cráneo con la dosis requisito, en 50-100 µl de PBS. Los animales son monitoreados diariamente para pérdida de peso, morbilidad y muerte. El LD_{50} para un vector vírico es luego calculado de la muerte acumulada de ratones durante el rango de concentraciones probadas.

Secuencias de antígeno de ácido nucleico heterólogo

En ciertas modalidades, la invención suministra VSV sinérgicamente atenuado y genéticamente modificado (que utiliza unos métodos de paso en serie de la presente invención a un MOI bajo) que comprende además una secuencia de ARN extraño como una unidad transcripcional separada insertada en o que remplaza un sitio del genoma no esencial para la replicación, donde la secuencia de ARN extraño (que está en la codificación negativo) dirige la producción de una proteína capaz de ser expresad en una célula huésped infectada mediante VSV. Este genoma recombinante se produce originalmente mediante la inserción de un ADN extraño que codifica la proteína en el cADN del VSV. En ciertas modalidades, cualquier secuencia de ADN que codifica un antígeno inmunogénico, que produce inmunidad profiláctica o terapéutica contra una enfermedad o trastorno, cuando se expresa como una proteína de fusión o no fusión en un VSV sinérgicamente atenuado recombinante de la invención, solo o en combinación con otros ingredientes expresados por los mismos o diferentes VSV, se aísla y se incorpora en el vector VSV para uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

En ciertas modalidades, la expresión de un antígeno mediante un VSV recombinante sinérgicamente atenuado y adicionalmente genéticamente modificado (se utilizan los métodos de la invención) induce una respuesta inmune contra un microorganismo patógeno. Por ejemplo, un antígeno puede desplegar la inmunogenicidad o la antigenicidad de un antígeno encontrado en bacterias, parásitos, virus, u hongos que son agentes causantes de enfermedades o trastornos. En una modalidad, se utilizan los antígenos que despliegan la antigenicidad o la inmunogenicidad de un antígeno de un patógeno humano u otros antígenos de interés.

Para determinar la inmunogenicidad o la antigenicidad al detectar la unión al anticuerpo, se utilizaron varios inmunoensayos conocidos en la técnica, que incluyen pero no están limitados a, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo que

utilizan técnicas tales como los radio inmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) inmunoensayos de "emparedado", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión de gen, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (que utilizan oro coloidal, marcadores de enzima o radio isótopos, por ejemplo), Western Blots, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo ensayos de aglutinación de gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación complementada, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, ensayos de inmunoelectroforesis, ensayos de neutralización, etc. En una modalidad, la unión de anticuerpos se mide al detectar u marcador sobre el anticuerpo primario. En otra modalidad, el anticuerpo primario se detecta al medir la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una modalidad adicional, el anticuerpo secundario se marca. Muchos medios son conocidos en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo. En una modalidad para detectar la inmunogenicidad, las respuestas mediadas por célula T se ensayan mediante métodos estándar, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo*, ensayos de tetrámero, ensayos de elispot o en ensayos *in vivo* de hipersensibilidad del tipo retrasado.

Los parásitos y las bacterias que expresan epítopos (determinantes antigénicos) que se expresan mediante VSV sinérgicamente atenuado (en donde el ARN de extraño dirige la producción de un antígeno del parásito o bacteria o un derivado de este que contiene un epítopo de este) incluye pero no está limitado a aquellos listados en la tabla 1.

En otra modalidad, el antígeno comprende un epítopo de un antígeno de un nematodo, para proteger contra los trastornos causados por tales gusanos. En otra modalidad, cualquier secuencia de ADN que codifica el epítopo del Plasmodio, que cuando se expresa mediante un VSV recombinante, es inmunogénico en un huésped vertebrado, se aísla para la inserción en el (-) ADN del VSV de acuerdo con la presente invención. Las especies de plasmodio que sirven como fuentes de ADN incluyen, pero no están limitadas a, los parásitos de malaria humana *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, y los parásitos de malaria animal *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. knowlesi, y P. cynomolgi.* En aun otra modalidad, el antígeno comprende un péptido de la subunidad β de la toxina de la Cólera.

Los virus que expresan los epítopos que se expresan mediante VSV sinérgicamente atenuados (en donde el ARN extraño dirige la producción de un antígeno del virus o un derivado de este que comprende un epítopo de este) incluye, pero no está limitado a, aquellos listados en la Tabla 2, que listan tales virus por familia por propósitos de conveniencia y no de limitación.

En modalidades especificas, el antígeno codificado por las secuencias extrañas que se expresan luego de la infección de un huésped por el VSV atenuado, despliegan la antigenicidad o inmunogenicidad de una hemaglutinina del virus de la influenza; la glucoproteína del virus G sincital respiratorio humano (G); la glucoproteína gD de la hemaglutinina del virus del sarampión o del virus del herpes simplex tipo 2.

Tabla 1

Parásitos y Bacterias que Expresan Epítopos Que se pueden expresar mediante VSV

PARÁSITOS	BACTERIAS
plasmodium spp.	*Vibrio cholerae*
Eimeria spp.	*Streptococcus pneumoniae*
Nematodes	*Streptococcus agalactiae*
Schistosoma	*Streptococcus pyogenes*
Leishmania	*Neisseria meningitidis*
	Neisseria gonorrhoeae
	Corynebacterium diphtheriae

295

	Staphylococcus aureus
	Staphylococcus epidermidis
	Clostridium tetani
	Bordetella pertussis
	Haemophilus spp. (por ejemplo, *influenzae*)
	Chlamydia spp.
	Enterotoxigenic *Escherichia coli*
	Helicobacter pylori
	Mycobacteria

Tabla 2

Virus que Expresan los Epítopos que se pueden expresar mediante VSV

I. Picornaviridade
Enterovirus
Poliovirus
Coxsackievirus
Ecovirus
Rinovirus
Virus de la Hepatitis A
II. Caliciviridade
Grupos Norwalk de virus
III. Togaviridade y Flaviviridade
Togavirus (por ejemplo, Virus del Dengue)
Alfavirus

Flavivirus (por ejemplo, virus de la Hepatitis C)
Virus de la Rubéola
IV. Coronaviridade
Cononavirus
V. Rabdoviridade
Virus de la rabia
VI. Filoviridade
Virus de Marbug
Virus del Ebola
VII. Paramixoviridade
Virus de Parainfluenza
Virus de las paperas
Virus del sarampión
Virus sincital respiratorio
Metaneumovirus
VIII. Ortomixoviridade
Ortomixovirus (por ejemplo, virus de la Influenza)
IX. Bunyaviridade
Bunyavirus
X. Arenaviridade
Arenavirus
XI. Reoviridade
Reovirus
Rotavirus
Orbivirus
XII. Retroviridade
Virus de la leucemia de célula T Humana tipo I

Virus de la leucemia de célula T humana II
Virus de Inmunodeficiencia Humana (por ejemplo, tipo I y tipo II
Virus de la Inmunodeficiencia del simio
Lentivirus
XIII. Papovaviridade
Poliomavirus
Papilomavirus
XIV. Parvoviridade
Parvovirus
XV. Herpesviridade
Virus del Herpes simplex
Virus de Epstein-Barr
Citomegalovirus
Virus de la Varicela Zoster
Herpes virus Humano 6 Herpes virus Humano 7
Virus del Herpes Cercopitecine 1 (virus B)
XVI. Poxviridade
Poxvirus
XVIII. Hepadnaviridade
Virus de la Hepatitis B
XIX. Adenoviridade

Otros antígenos que se expresan mediante VSV atenuado incluyen, pero no están limitados a, aquellos que despliegan al antigenicidad o la inmunogenicidad de los siguientes antígenos: Poliovirus I VP1; glucoproteínas sobre del VIH 1; el antiguo de superficie de la Hepatitis B; la toxina de Difteria; el epítopo 24M del streptococcus, SpeA, SpeB, SpeC o peptidasa C5a; y pilin gonocóxico.

En otra modalidades, el antígeno expresado por el VSV atenuado y adicionalmente genéticamente modificado despliega la antigenicidad o la inmunogenicidad de los virus de seudorabias g50 (gpD), los virus de seudorabias II (gpB), el gIII del virus de seudorabias (gpC), la glucoproteína del virus de las

seudorabias H, la glucoproteína E del virus de las seudorabias, la glucoproteína 195, de la gastroenteritis transmisible, la proteína de matriz de la gastroenteritis transmisible, la glucoproteína 38 del rotavirus de cerdos, la proteína cápsida de parvovirus de cerdo, el antígeno protector de Serpulina Hidodisenteria, la glucoproteína 55 de la Diarrea Vírica Bovina, la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, la hemaglutinina de la gripa del cerdo, o la neuraminidasa de la gripa del cerdo.

En ciertas modalidades, el antígeno expresado por el VSV atenuado y adicionalmente genéticamente modificado despliega la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno derivado de un patógeno de canino o felino, que incluye, pero no está limitado a, virus de la leucemia felina, y virus del moquillo canino, adenovirus canino, parvovirus canino y similares.

En otras ciertas modalidades, el antígeno expresado por el VSV atenuado y además genéticamente modificado despliega la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno derivado de Serpulina Hiodisenteriae, virus de enfermedad de pie y boca, virus del colera Hog, virus de la influenza de cerdo, virus de la fiebre de cerdo Africano, hiopneumonia de Micoplasma, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa (por ejemplo, glucoproteína E o glucoproteína G del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa), o el virus de laringotraqueitis infecciosa (por ejemplo, la glucoproteína G o la glucoproteína I del virus de la laringotraqueitis infecciosa).

En otra modalidad, el antígeno despliega la antigenicidad o la inmunogenicidad de una glucoproteína del Virus La Crosse, el Virus de Diarrea Neonatal de Becerro, el Virus de la Encefalomielitis Equina Venezolana, el virus Punta Toro, el virus de la Leucemia de Murino o el Virus Tumoral Mamario de ratón.

En otras modalidades, el antígeno despliega la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno de un patógeno humano que incluye pero no está limitado al herpes virus humano, el virus-1 del herpes simplex, el virus-2 del herpes simplex, el citomegalovirus humano, el virus Epstein-Barr, el virus de la varicela Zoster, el herpes virus-6 humano, el herpes virus-7 humano, el virus de la influenza humana, el virus de la inmunodeficiencia humana (tipo 1 y/o tipo 2), los virus de la rabia, los virus del sarampión, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el plasmodium falciparum, y el Bordetella pertussis.

Los antígenos o derivados potencialmente útiles de estos para uso como antígenos expresados mediante VSV atenuados se identifican con varios criterios, tales como el involucramiento del antígeno en la neutralización de la infectividad del patógeno, el tipo o especificidad de grupo, el reconocimiento por el antisuero de los pacientes o las células inmunes, y/o la demostración de efectos protectores del antisuero o de células inmunes especificas para el antígeno.

En otra modalidad, el RN extraño del VSV atenuado dirige la producción de un antígeno que comprende un epítopo, que cuando el VSV es atenuado se introduce dentro del huésped deseado, induce una respuesta inmune que protege contra una condición o trastorno causada por la entidad que contiene el epítopo. Por ejemplo, el antígeno puede ser un antígeno específico tumoral o un antígeno asociado a tumor, para la inducción de respuesta inmune protectora contra un tumor (por ejemplo un tumor maligno). Tales antígenos específicos de tumor o asociados a tumor incluyen, pero no están limitados a, el antígeno de pan-carcinoma KS 1/4; el antígeno de carcinoma de ovario (CA125); el fosfato de ácido prostático; el antígeno especifico de próstata; el antígeno asociado a melanoma p97; el antígeno de melanoma gp75; el antígeno de melanoma de peso molecular alto y el antígeno de membrana específico de próstata.

El ADN extraño que codifica el antígeno, que se inserto en el sitio no esencial del ADN del VSV atenuado, comprende adicionalmente una secuencia de ADN extraño que codifica una citoquina capaz de ser expresada y estimulando una respuesta inmune en un huésped infectado mediante VSV atenuada. Por ejemplo, tales citoquinas incluyen pero no están limitadas a interleuquinas 1α, 1β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, interferón-α, interferón-β, interferón-γ, factor estimulante de la colonia de granulocito, factor estimulante de la colonia de macrófago granulocito y los factores α y β de la necrosis tumoral.

Composiciones inmunogénicas y farmacéuticas

En ciertas modalidades, la invención está dirigida a una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector VSV genéticamente modificado que comprende por lo menos dos diferentes clases de mutaciones en su genoma y por lo menos una secuencia de ARN extraña insertada o

300

que remplaza una región del genoma VSV no esencial para la replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenia del VSV. El VSV genéticamente modificado puede adicionalmente ser adaptado para crecimiento en cultivo de célula al pasar el virus durante aproximadamente 5 a 15 pasos a un MOI bajo como se describió aquí y este VSV adicionalmente genéticamente modificado y atenuado se puede utilizar para preparar las composiciones inmunogénicas.

Los vectores VSV sinérgicamente atenuados y genéticamente modificados de la invención se formulan para la administración aun sujeto mamífero (un humano). Tales composiciones comprenden típicamente el vector VSV y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en lo sucesivo el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibacterianos y/o agentes fungosos, agentes que despliegan isotonicidad de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto hasta ahora como cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el vector VSV, tales medios se utilizan en las composiciones inmunogénicas de la invención. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Así, una composición inmunogénica VSV de la invención se formula para ser compatible con la ruta de administración pretendida. Ejemplos de rutas de administración incluyen parenteral (por ejemplo intravenosa, intradérmico, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal) y mucosita (por ejemplo, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal, respiratoria). Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea incluye los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol y tros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como benzil alcohol o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilenodiaminotetraacético; amortiguadores tales como acetatos, acetatos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se ajusta con ácidos o bases tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o frascos de dulces de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o las dispersiones y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremofor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la proporción en que exista una fácil aplicación con jeringa. Esta debe ser estable bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento y se debe preservar contra la acción de contaminación de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador es un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol liquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. Se mantiene la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se logra mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido ascórbico y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azucares, polialcoholes tales como mannitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de composiciones inyectables se realizan al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar el vector VSV en la cantidad requerida (o dosis) en un disolvente apropiada con 1 o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiere, seguida por la esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril de esta.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en la forma de un rociado de aerosol de u recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor adecuado (por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador). La administración sistémica también puede ser mediante medios de mucosa o transdérmicos. Para la administración a la mucosa o transdérmica, los penetrantes apropiados a la barrera a ser permeada se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la administración a la mucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración a la mucosa se logra a través del uso de unos rociadores o supositorios nasales. Los compuestos también se preparan en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

En ciertas modalidades, es ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para la facilidad de administración y la uniformidad de la dosis. La forma unitaria de dosis como se utilizó aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como las dosis unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asocio con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosis de la invención están dictadas por y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a ser logrado, y las limitaciones inherentes en la técnica de componer tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Todas las patentes y publicaciones citadas aquí se incorporan aquí como referencia.

La producción de la composiciones inmunogénicas sectorizadas VSV generalmente incluyen infectar un cultivo de célula adecuado (huésped) con VSV recombinante, hacer crecer el VSV en el cultivo celular, cosechar el fluid de cultivo de célula durante el tiempo apropiado y purificar el VSV desde el fluido de cultivo de célula. El uso de los vectores VSV, y las composiciones inmunogénicas de estos, en las aplicaciones clínicas requerirá de muestras de VSV (o dosis) de la pureza apropiada con el fin de cumplir con las reglamentaciones de seguridad de las varias autoridades de seguridad de fármacos alrededor del mundo (por ejemplo la

Administración de Alimentos y Drogas (FDA), la agencia de Medicinas Europea (EMEA), y la Rama de Productos y Alimentos de la Salud Canadiense (HPFB), etc.)-

Sin embargo, es típicamente difícil separar el VSV de los contaminantes del cultivo celular (por ejemplo las proteínas de impureza de cultivo celular y el ADN) se obtiene el VSV de la pureza apropiada y se produce utilizando los procesos de purificación VSV habitualmente disponibles (por ejemplo purificación por vía de centrifugación de gradiente de sacarosa). Por ejemplo, utilizando los procesos de purificación habitualmente disponibles, existe típicamente una relación inversa entre la pureza y la recuperación (rendimiento porcentual) de las muestras VSV, haciendo de esta manera difícil elaborar cantidades suficientes de VSV purificado. Adicionalmente, en los procesos basados en los biorreactores de hoy, las concentraciones de célula crecientes y los tiempos de cultivo mayores dan como resultado títulos VSV mayores, con el incremento concomitante de los desechos de células y las concentraciones de los constituyentes orgánicos en el fluido biorreactor, que complica además los procesos de purificación de VSV.

La ultra centrifugación del gradiente de sacarosa ha sido el método estándar para la purificación de virus (incluyendo la purificación de VSV) desde 1964 (Yamada et al., 2003 BioTechniques, 34(5):1074-1078, 1080; Brown et al., 1967 J. Immun., 99(1):171-7; Robinson et al., 1965 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 54(1):137-44; Nishimura et al., 1964 Japan. J. Med. Sci. Biol., 17(6):295-305). Sin embargo, en la medida en que las concentraciones de virus se incrementan, concomitantemente se incrementan los desechos en células, el ADN de los huéspedes y también se presentan impurezas de la proteína, que son muy difíciles de remover a mayores concentraciones por día de ultra centrifugación de gradiente de sacarosa. Además, la ultra centrifugación del gradiente de sacarosa es extremadamente costosa y a escala. La concentración y purificación del VSV mediante precipitación de polietilenglicol (PEG) (McSharry et al., 1970 Virol., 40(3):745-6) tiene problemas similares de altos niveles de impureza.

Los virus de relativamente alta calidad han sido obtenidos por vía de cromatografía de exclusión de tamaño (Transfiguración et al., 2003 Human Gene Ther., 14(12):1139-1153; Vellekamp, et al., 2001 Human Gene Ther., 12(15):1923-36; Rabotti et al., 1971 Comptes Rendís des Seances de l'Academie des Sciences, Serie D: Sciences Naturelles, 272(2):343-6; jacoli et al., 1968 Biochim. Biophys. Acta, Genl

304

Subj., 165(2):99-302). Sin embargo, debido a los costos del proceso y a las dificultades operativas, generalmente no es factible la producción de virus a gran escala. La cromatografía de afinidad tal como heparina (Zolotukhin et al., 1999 Gene Ther., 6(6):973-985), lectina (Kaarsnaes et al., 1983 J. Chromatog., 266:643-9; Kristiansen et al., 1976 Prot. Biol. Fluids, 23:663-5) y sulfato de Matrex™ Cellufine™ (Downing et al., 1992 J. Virol. Meth., 38(2):215-228), ha encontrado alguna aplicación en la purificación de virus. La Heparina y la lectina generalmente no son preferidas (o utilizadas) para la producción de virus cGMP debido a posibles problemas de lixiviación, que requerirían pruebas adicionales antes de la liberación del producto.

Purificación de afinidad de los virus que utilizan sulfato de Matrex™ Cellufine™ es un tema no resuelto, debido a la deficiencia de la purificación de virus, la calidad de los virus y la regeneración de columna. Para la purificación del VSV, se requieren columnas de muy gran afinidad (por ejemplo 0.2 L de resina de sulfato Matrex™ Cellufine™ por método de cultivo de célula; resultados no publicados de la vacuna de Wyeth). Una producción baja en virus se observo cuando se purifico por vía de cromatografía de intercambio de ion, bien sea sola o en combinación con otros tipos de técnicas cromatográficas tradicionales utilizadas en la purificación de virus (Publicación de la Patente Internacional No. WO2006/011580; Specht et al., 2004 Biotech. Bioeng., 88(4):465-173; Yamada et al., 2003, citada anteriormente; Vellekamp et al., 2001 citada anteriormente; Zolotukhin et al., 1999, citada anteriormente; (la Publicación de Patente Internacional No. WO1997/06243; Kaarsnaes et al., 1983, citada anteriormente).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, se debe entender que estos ejemplos son solo para ilustración y no pretenden ser completamente definitivos para las condiciones y alcance de esta invención. Se debe apreciar que cuando se han dado condiciones de reacción típica (por ejemplo temperatura, tiempos de reacción, etc.), también se pueden utilizar las condiciones tanto anterior como la de delante de los rangos especificados, aunque es generalmente menos conveniente. Todas las partes y porcentajes referidas aquí están en una base en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique de otra manera.

305

EJEMPLO 1: ESTUDIO DEL PASO DE VIRUS CON EL SEROTIPO VSV INDIANA (IN) Y VSV NEW JERSEY

Las Figuras 1 ilustran I organización genómica del wt VSVy del attn VSVN4CT1 gag1. La Figura 2 es un perfil de un protocolo experimental utilizado para virus de paso de serie de células Vero. Los virus en cada quinto paso fueron analizados mediante los ensayos indicados. La Figura 8A-8L muestra la comparación de las secuencias de nucleótido (NT) y las secuencias de aminoácido (AA) de los virus originales (paso 0 o P0) y el paso 25 del serotipo VSV Indiana. Las sustituciones NT y AA en el virus de paso se muestran resaltadas. Las Figura 9A y 9B muestran la comparación de las secuencias de nucleótido (NT) y de aminoácido (AA) de los virus originales (paso 0 o P0) y el paso 25 del serotipo VSV New Jersey. Las sustituciones NT y AA en el virus de paso se muestran resaltadas.

El $rVSV_{IN}N4CT1Gag1$ atenuado se utilizo como material de partida para pasar en el cultivo estacionado Vero. Las células Vero en las hojuelas T25 se inocularon con el virus atenuado a una multiplicidad de infección de 0.001 en DMEM (libre de suero, libre de antibióticos). Los recipientes se incubaron a 32°C durante 2 a 3 días cuando fue evidente el efecto citopático vírico (CPE) en 90-100% de las monocapas de célula. El medio de cultivo se cosecho, clarifico por centrifugación a baja velocidad (1500 rpm, 10 min). Después de la adición de un amortiguador de Fosfato de Sacarosa 1X (SP) (concentración final), el virus clarificado se congelo instantáneamente en un baño de etanol con hielo seco y se almaceno a $\leq$ 60°C. este virus se marco como el paso 1 o P1 del $rrVSV_{IN}N4CT1Gag$. Este virus fue utilizado de manera similar para inocular los recipientes T25 frescos de las células Vero en el moi del 0.01 para producir P2. Este proceso, denominado paso en serie, se repitió 25 veces para hacer los virus P1 a P25. En cada paso, el virus se titulo mediante ensayos de infectividad desarrollado en un monocapa Vero.

El acrecentamiento de las sustituciones de aminoácido luego de los pasos en serie utilizando el serotipo VSVin se muestra en la Figura 3. Las cinéticas de crecimiento de los virus VSVin de paso en el MOI del 0.01 en las células Vero se muestra en la Figura 5.

El acrecentamiento de las sustituciones d aminoácido luego de los pasos en serie utilizando el serotipo VSVnj se muestra en la Figura 4. Las cinéticas de

crecimiento de los virus VSVnj de paso en el MOI de 0.01 e células Vero se muestra en la Figura 6.

EJEMPLO 2: PRODUCCIÓN DE VSVN4CT1GAG1 RECOMBINANTE

Las cepas San Juan adaptada a un cultivo de tejido del serotipo VSV Indiana (VSVin) y su correspondiente cADN genómico se suministraron por el Dr. John K. Rose de la Universidad de Yale, new Haven, CT y se utilizaron en la derivación de los recombinantes rVSVN4CT1gag1.

Un procedimiento detallado para la preparación del ADN del plásmido rVSVinN4CT1gag1 se ha descrito anteriormente (Clarke et al., J Vorology, 81, 2056-64, 2007 y Cooper at al., J. Virology, 82:207-29, 2008). El vector de glucoproteína del serotipo NJ análogo, rVSVnjN4CT1gag1 se genero al remplazar el gen Gin con la forma truncada del gen Gnj que será descrito en Cooper et al, 2008. la Figura 1 describe esquemáticamente el orden de los genes víricos dentro de los genomas víricas para los recombinantes VSV atenuados derivados del wt VSV.

Los virus infecciosos se recuperaron del cADN genómico luego de la transfección de las células Vero con el plásmido del genoma vírico que contiene el genoma de longitud completa y los cinco plásmidos de expresión que codifican individualmente las proteínas VSV N, P, L, M y G. la expresión de estos plásmidos está bajo el control del promotor del ARN polimerasa T7. La polimerasa se suministró mediante eletroporación del plásmido que codifica la ARN polimerasa T7 bajo control del citomegalovirus humano inmediatamente antes de la región promotora/mejoradora. El rVSV se purifico mediante aislamiento clonal 3 a 4 veces y se amplifico al paso en las células Vero 3 veces. El rescate vírico y toda la purificación subsecuente y la amplificación se desarrollaron en células Vero. El suero bovino fetal (FBS) utilizado en el rescate de virus fue de origen Neo Zelandés. Todas las etapas después del rescate se desarrollaron en un medio libre de suero (DMEM). Todas las etapas después de la purificación clonal se desarrollaron en medio libre de suero, libre de antibiótico (DMEM).

En resumen, aproximadamente 2.0 x 10^7 células Vero provenientes de un recipiente T150 se colocaron en un tubo que contiene 10μg del plásmido de cADN vírico de longitud completa $rVSV_{IN}N4CT1Gag1$ y cinco plásmidos de soporte que

codifican las proteínas N, P, L, M y G del VSV bajo control del promotor T7 (10, 4, 1, 1, 2μg respectivamente). Un séptimo plásmido se agrego a 50μg para suministrar la ARN polimerasa T7; este plásmido se control mediante ARN polimerasa II celular. La suspensión se sometió a electroporación y las células se resuspendieron y se transfectaron a un recipiente T150. El recipiente se incubó a 37°C durante 3 horas; se calentó con choque a 43°C durante 5 horas y luego se incubo durante toda la noche a 37°C. el medio se reemplazo al siguiente día y el recipiente se incubó a 32°C al segundo día. El recipiente se inspeccionó cada día hábil por signos de CPE. Los recipientes que muestran signos de CPE fueron seguidos hasta que se logró 80-100% de CPE. En este punto, el medio que contiene el virus rescatado (sobrenadante de rescate) se cosechó, se suplementó con 1X SP[1] como un estabilizador de virus, se congeló instantáneamente y se almacenó a ≤ -60°C. Todos los sobrenadantes de rescate se seleccionaron para la expresión del Gag mediante análisis de Western blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos de Gag; los virus rescatados que muestran la expresión del Gag se sometieron al secuenciamiento genómico vírico. Uno o más clones víricos de cada serotipo que tiene las secuencias correctas fueron escogidos para purificación y amplificación de placa adicional.

Las placas de virus se desarrollaron sobre células Vero en placas de seis pozos con agar sobrepuesto en el DMEM con Gentamicina y sin suero. El sobrenadante de rescate de que contiene virus infecciosos se diluyó en DMEM con el fin de lograr ≤ 5 placas por pozo. Un número de placas bien aisladas se escogen, se suspenden en DMEM y se someten de 2 a 3 rondas adicionales de purificación de placa. La placa líder proveniente de la cuarta clonación se escoge y se suspende en DMEM y luego se utiliza durante 3 sucesiones amplificaciones de virus en las células Vero en placas de seis pozos, los recipientes T25 y los recipientes T150, respectivamente. La amplificación se desarrollo utilizando DMEM sin suero y sin antibióticos. El virus recombinante obtenido por este proceso se denominó como virus de bajo paso y se utilizó para el pasado adicional en las células Vero para la atracción de las células como se describe adelante.

EJEMPLO 3: PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EL PASO DE SERIE

Los recombinantes VSV de paso bajo (P0) para cada serotipo se pasaron 25 veces sucesivas sobre la monocapa de célula Vero en un recipiente T-25 como se

muestra en la Figura 2. Las células Vero que crecieron en el medio libre de suero se infectaron con infección múltiple (MOI) de ~0.01 e incubadas en 32°C /5% de CO_2 de incubadora hasta que se hizo visible el CPE extenso, usualmente a las 48 a 72 horas pos infección. Después de cada amplificación, el cultivo de virus se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad y se estableció con 1X SP de amortiguador de fosfato de Sacarosa. El 10X SP contiene por litro de fosfato de potasio, dibásico, 12.2 gm; fosfato de potasio, monobásico, 5.17gm; sacarosa, 746.2 gm). Los cultivos de virus de los pasos 1 a 25 se titularon mediante ensayo de placa como se describió anteriormente (Clarke et al., J. Virol., 81: 2056-64, 2007. La secuenciación de nucleótido se desarrolló cada quinta pasada.

EJEMPLO 4: RESULTADOS DEL ESTUDIO IC LD50 EN RATONES

Estudios IC LD50 en ratones

Los ratones jóvenes son altamente sensibles a la infección con VSV luego de la inoculación intracraneana (IC) causando una rápida morbilidad y mortalidad. El modelo animal de neurovirulencia de ratón IC LD50 se ha mostrado por ser altamente sensible y capaz de discriminar cambios en la virulencia de los VSV recombinantes (Clarke et al., J. Virol., 81, 2056-64, 2007). Así los ratones que recibieron el wt VSVin perdieron peso dramáticamente y murieron a los 2 a 4 días pos inoculación con LD50 de 1 a 2 pfu. Los virus que contienen los truncamientos CT o las mezclas de gen de otra parte, mostraron ser más atenuadas que el wt VSV con LD50 de 12 a 21 pfu (Clarke et al., J. Virol., 81, 2056-64, 2007). Sin embargo, se vio una disminución dramática de la virulencia cuando se combinó la mutación CT1 con las mutaciones de los cambios de gen (N4 y o gag1). Por ejemplo, el rVSVinN4CT1gag1 de bajo paso exhibió un nivel extremadamente bajo de virulencia con LD50 de $>10^7$ pfu, la dosis más alta probada en este modelo animal. Los ratones inoculados con este virus inicialmente perdieron 10 a 20% de su peso por su inoculación, pero recuperaron el peso normal en 2 a 3 semanas. Resultados similares se vieron en el serotipo NJ del virus (Cooper et al., J Virology, 82, 207-29, 2008).

El VSVN4CT1gag1 adaptado al Vero de esta invención en los pasos 15 a 25 para cada serotipo (IN y NJ) fue probado en el modelo de animal IC LD50 de murino; no se dio ningún incremento de la virulencia, con el LD50 de $>10^7$ pfu para todos los virus de paso como se mostró en la Figura 7. Estos resultados mostraron que las

mutaciones adaptativas acrecentadas en los virus pasados en los cultivos celulares no impactaron sobre la virulencia del virus. La baja virulencia, junto con su replicación mejorada a altos títulos hace los virus pasados adecuados para prueba en ensayos clínicos humanos.

Método

Los detalles experimentales de los estudios de IC LD0 de ratón son dados en Clarke et al. (Clarke et al, J. Virol., 81, 2056-64, 2007) y Cooper et al. (Cooper et al., J Virology, 82, 207-29, 2008). Ratones Webster suizos hembras de cinco semanas de edad fueron anestesiados e inyectados IC con diluciones de 10 veces de virus en 30 µl en volumen (10 animales por dilución, con diluciones hechas en el rango alrededor del anticipado LD50). El peso y el estatus de salud se registraron diariamente durante dos semanas. Los ratones quedaron bilateralmente paralizados o que mostraron signos significativos de dolor o enfermedad severa fueron sacrificados y registrados como sucumbientes a la enfermedad VSV. El LD50 se determinó mediante el método de Reed y Muench, (Am. J. Hyg, 27, 493-97, 1938).

Resumen

Comparados con los anteriores virus de paso rVSVN4CT1-gag1 (PO), los virus P15 pasados serialmente crecieron a títulos mayores. Esto facilitó la elaboración a gran escala de material de prueba clínico (CTM). Además, la estabilización de las mutaciones adaptativas por P15 suministró virus con consistencia de elaboración lote a lote durante la producción de CTM. Por otra parte, la seguridad del perfil de los virus pasados se mantiene sin cambios como se probó con el modelo animal IC LD50 de murino, de tal modo manteniendo la conveniencia para la evaluación clínica.

EJEMPLO 5: ESCALADA DEL VIH SECTORIZADO

Un biorreactor de 10-L (volumen de trabajo 8-L) que contiene microportadores Citodex I a 7.5 gramos/L se inoculó con células Vero a aproximadamente 5 x 10^5 células/mL. El biorreactor se perfusionó con volúmenes de cultivo de 0.5 por día de medio VP-SFM Gibco (con o sin rojo fenol) a 37°C. después de 70-90 horas o cuando la densidad celular fue ≥2x 10^6 células /mL, el cultivo se infectó a un MOI de 0.001 a 32°C con bajo paso (≤P5) o alto paso (P15) del virus VSV N4CT1-gag1. Los cultivos

se muestrearon 2-3 veces diariamente y finalmente se cosecharon a 48-60 horas post infección.

El escalamiento del serotipo Indiana a biorreactores de 10 litros, fue probado tanto para paso bajo (≤P5) como paso alto (P15). Las corridas del biorreactor X-BRN10-VSV-14, 17, y 28 se completaron utilizando material de virus de bajo paso (línea sólida) para infectar los cultivos. Las corridas del biorreactor X-BRN10-VSV-31, 33 y 34 se completaron utilizando semillas de virus de investigación de alto paso (líneas punteadas). Las cinéticas de crecimiento para cada corrida se muestran en la Figura 10. El número de paso del virus se indica en paréntesis en la leyenda de la figura.

Tanto para las pasadas de lato como bajo paso, cada conjunto de corridas es consiste uno con el otro. Las corridas del biorreactor de alto paso produjeron hasta dos logs de títulos mayores que las corridas de paso bajo. Con base en la cinéticas de crecimiento del material de paso alto, el tiempo de cosecha se determinó por ser de aproximadamente 48 horas post infección.

El escalamiento del serotipo New Jersey a los biorreactores de 10 litros, se probó de nuevo tanto con paso bjo (≤P5) como paso alto (P15). Las corridas del biorreactor X-BRN10-VSV-15, 18, 19, 20, 22 y 23 se completaron utilizando un material de virus de paso bajo (línea sólida) para infectar los cultivos. Las corridas del biorreactor X-BRN10-VSV-36, y 37 se completaron utilizando una semilla de virus de investigación de alto paso (líneas punteadas). Las cinéticas de crecimiento para cada corrida se muestran en la figura 11.

Hubo más pocas diferencias entre las corridas de paso bajo y las corridas de paso alto para la construcción New Jersey que lo que se observó para la construcción Indiana. Con base en las cinéticas de crecimiento del material de paso alto, se determinó el tiempo de cosecha para el VSVnjN4CT1-gag1 por ser de aproximadamente 48 horas post infección, como fue el caso del VSVinN4CT1-gsg1. En con conclusión, el P15 NaCT1-gag1 dio como resultado un incremento de 35 veces en los títulos del biorreactor y un incremento de 45 veces en el numero de partículas de vidrios producidas por célula para Indiana y de un incremento de aproximadamente 5 veces en los títulos del biorreactor y de un incremento de 7

311

veces en el numero de partículas de virus producidas para la célula New Jersey. (Ver Tablas 3 y 4).

Tabla 3:

Comparación de las corridas del biorreactor VSVinN4CT1-gag1

ID de corrida	Numero de pasos	Volumen de cultivo (litros)	Densidad de célula @ infección (células/ml)	Tiempo de cosecha (hpi)	Titulo de cosecha (pfu/ml @ 50 hpi)	Partículas de virus por célula
BR-14	P1	8.0	2.96×10^6	48	1.20×10^6	0.4
BR-17	P2	8.0	3.07×10^6	50	2.55×10^6	0.8
BR-28	P3	7.0	2.78×10^6	47	1.84×10^6	0.7
BR-31	P16	8.0	2.25×10^6	88	8.51×10^7	37.8
BR-33	P16	8.0	2.24×10^6	50	4.50×10^7	20.1
BR-34	P16	8.0	1.99×10^6	51	7.10×10^7	35.7

312

Tabla 4:

Comparación de las corridas del biorreactor VSVnjN4CT1-gag1

Corrida ID	Numero de pasos	Volumen de cultivo (L)	Densidad de cultivo @ infección (células/mL)	Tiempo de cosecha (hpi)	Titulo pico	Partículas de virus por célula
BR-15	P1	8.0	3.52×10^6	72	5.28×10^6	1.5
BR-18	P3	8.0	3.06×10^6	72	1.72×10^7	5.6
BR-19	P3	7.0	3.36×10^6	66	1.46×10^7	4.3
BR-20	P3	7.0	3.65×10^6	66	7.26×10^6	2.0
BR-22	P4	7.0	4.27×10^6	50.5	3.41×10^7	8.0
BR-23	P4	7.0	2.78×10^6	47	1.07×10^7	3.9
BR-36	P16	8.0	2.42×10^6	72	5.57×10^7	23.0
BR-37	P16	8.0	2.31×10^6	50.3	8.36×10^7	36.2

313

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un virus de la estomatitis vesicular genéticamente modificado, aislado (VSV) que tiene por lo menos una mutación de aminoácido en una región que corresponde a por lo menos una de las siguientes posiciones:

los aminoácidos en las posiciones 119 o 142 de la proteína M;

los aminoácidos en la posiciones 109, 224, 438, 477, o 481 de la proteína G; y

los aminoácidos en las posiciones 205, 220 o 1450 de la proteína L.

2. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico que codifica el VSV genéticamente modificado comprende además un ácido nucleico que codifica a por lo menos un antígeno heterólogo, o fragmento de este.

3. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 1, en donde un antígeno heterólogo o fragmento de este es de un microorganismo patógeno.

4. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 3, en donde el microorganismo patógeno del cual el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se obtiene se selecciona del grupo que consiste de un virus, una bacteria, un protozoario y un hongo.

5. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 4, en donde el antígeno heterólogo se selecciona del grupo que consiste de un antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un antígeno HTLV, un antígeno SIV, un antígeno RSV, un antígeno PIV, un antígeno HSV, un antígeno CMV, un antígeno del virus Epstein-Barr, un antígeno del virus de la Varicela-Zoster, un antígeno del virus de las paperas, un antígeno del virus del sarampión, un antígeno del virus de la influenza, un antígeno del poliovirus, un antígeno de rinovirus, un antígeno de la hepatitis A, un antígeno del virus de la hepatitis B, un antígeno del virus de la hepatitis C, un antígeno del virus Norwalk, un

antígeno del togavirus, un antígeno de alfavirus, un antígeno del virus rubéola, un antígeno del virus de la rabia, un antígeno del virus Marburg, un antígeno del virus Ebola, un antígeno del virus papiloma, un antígeno del virus polioma, un antígeno del metapneumovirus, un antígeno del coronavirus, un antígeno del *Vibrio Cholerae*, un antígeno del *Plasmodium falciparum*, un antígeno del *Plasmodium vivax*, un antígeno del *Plasmodium ovale*, un antígeno del *Plasmodium malariae*, un antígeno del *Plasmodium Knowlesi*, un antígeno del *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno del *Streptococcus pyogenes*, un antígeno del *Helicobacter pylori*, un antígeno del *Streptococcus agalactiae*, un antígeno del *Neisseria meningitidis*, un antígeno del *Neisseria gonorrhoeae*, un antígeno del *Corynebacterium diphteria*, un antígeno del *Clostridium tetani*, un antígeno del *Bordetella pertussis*, un antígeno del *Haemophilus*, un antígeno de *Chlamydia* y un antígeno del *Escherichia coli*.

6. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 5, en donde el antígeno heterólogo comprende una proteína de VIH.

7. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 6, en donde la proteína del VIH se codifica mediante un gen seleccionado del grupo que consiste de *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* y *vpu*.

8. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 6, en donde la proteína de VIH es una proteína VIH gag.

9. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 8, en donde la proteína VIH gag tiene por lo menos una mutación en la posición 165, 270, 329 0 348.

10. El VSV genéticamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la mutación comprende un cambio de aminoácido conservador o no conservador.

11. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 1, en donde las mutaciones están en la posición 119 o 142 de la proteína M o están en ambas posiciones 119 y 142 de la proteína M.

12. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 1, en donde la mutación del aminoácido en la posición 119 de la proteína M es una mutación T → N y la mutación del aminoácido de la posición 142 de la proteína M es la mutación P → T.

13. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 1, en donde la mutación de los aminoácidos en la posición 109, 224, 438, 477 0 481 de la proteína G es una mutación K → N, N → T, S → I, A → V/G → L, o V → I, respectivamente.

14. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 1, en donde la mutación del aminoácido en la posición 205, 220 o 1450 de la proteína L es P → L, K → E, o L → I, respectivamente.

15. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 9, en donde la mutación de los aminoácidos en la posición 165, 270, 329, 348 de la proteína VIH gag es S → G, L → S, D → N o T → K, respectivamente.

16. El VSV genéticamente modificado de una malquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la mutación en una cualquiera o más de los aminoácidos da como resultado una estabilidad creciente del genotipo y/o fenotipo del virus

17. El VSV genéticamente modificado de la reivindicación 16, en donde la mutación de una cualquiera o más de los aminoácidos resulta adicionalmente en un rendimiento creciente en la producción del virus de una célula infectada con dicho virus.

18. El VSV genéticamente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende además por lo menos otras dos mutaciones en su genoma, las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste de una mutación sensible a la temperatura, una mutación puntual, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre G, una mutación del gen N no citopático, una mutación del ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción del gen G y una mutación de supresión del gen.

316

19. Un método para producir el VSV genéticamente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, el método comprende el paso en serie de un VSV en una línea de célula de mamífero continua a una baja multiplicidad de infección (MOI) que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU)/ml durante por lo menos 5-15 pasadas, en donde el virus tiene un titulo de 1 x 10^6 PFU/ml y por lo menos una o más de las mutaciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

20. El método de la reivindicación 19, en donde el virus tiene un titulo de por lo menos 1 x 10^7 PFU/ml.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, en donde la línea celular es una línea celular Vero, BHK, o 293.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde el método da como resultado 5 a 100 veces más rendimiento del virus comparado con aquel obtenido con una cepa de virus que no se ha pasado durante aproximadamente 5 a 15 veces a un MOI bajo que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU)/célula.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde el VSV genéticamente modifica demuestra un incremento en la estabilidad del genotipo y/o genotipo del virus.

24. Una composición inmunogénica que comprende una cualquiera o más del VSV genéticamente modificado y una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.

25. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, que comprende además un ayudante.

26. Un método para proteger un mamífero contra la infección con un organismo patógeno, el método comprende administrar una cantidad inmunológicamente efectiva del VSV genéticamente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

27. El método para proteger un mamífero contra infección con un microorganismo patógeno, el método comprende administrar una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25.

28. Un método para adaptar un virus para crecer en el cultivo de célula que comprende

a. infectar el cultivo de célula con el virus a una multiplicidad de infección baja (MOI) que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa (PFU) por célula;

b. cosechar el medio de cultivo de célula que contiene el virus;

c. clarificar el medio de cultivo de célula;

d. congelar el medio del cultivo de célula;

e. repetir las etapas a) a d) durante aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces,

en donde el método da como resultado de 5 a 100 veces el incremento en la producción/rendimiento de virus y un incremento en la estabilidad de las características del genotipo y el fenotipo del virus.

29. El método de la reivindicación 28, en donde el virus es un virus atenuado.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el método permite mantener cualquiera del o las mutaciones preexistentes asociadas con la atenuación del virus.

31. El método de la reivindicación 29, en donde el método permite mantener un perfil de baja neurovirulencia asociado con la atenuación del virus.

318

32. El método de la reivindicación 28, en donde el método se utiliza para producción a gran escala de una composición inmunogénica.

33. El método de la reivindicación 32, en donde el método resulta en un rendimiento 5 a 100 veces mayor del virus comparado con aquel obtenido con una cepa de virus que no ha pasado durante aproximadamente 5 a 15 veces a una baja multiplicidad de infección que varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 unidades formadoras de placa por célula.

34. El método de la reivindicación 30, en donde él o las mutaciones preexistentes asociadas con la atenuación del virus se seleccionan del virus que consiste de una mutación sensible a temperatura, una mutación puntual, una mutación de mezcla de gen, una mutación madre G, una mutación del gen M no citopático, una mutación del ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción del gen G y una mutación de supresión del gen.

35. El método de la reivindicación 29, en donde el virus atenuado es una cepa de virus de estomatitis vesicular (VSV).

36. El método de la reivindicación 30, en donde el VSV tiene por lo menos una mutación de aminoácido en una región que corresponde a por lo menos una de las siguientes posiciones:

los aminoácidos en las posiciones 129 o 142 de la proteína M;
los aminoácidos en las posiciones 109, 224, 438, 477 o 481 de la proteína G;

los aminoácidos en las posiciones 205, 220 o 1450 de la proteína L.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la mutación comprende un cambio de aminoácido conservador o no conservador.

38. El método de la reivindicación 36, en donde la mutación está en cualquier posición 119 o 142 de la proteína M o están ambas posiciones 119 y 142 de la proteína M.

39. El método de la reivindicación 38, en donde la mutación del aminoácido en la posición 119 de la proteína M es una mutación T → N, y la mutación del aminoácido en la posición 142 de la proteína M es una mutación P → T.

40. El método de la reivindicación 36, en donde la mutación de los aminoácidos en la posición 109, 224, 438, 477 o 481 de la proteína G es una mutación K → N, N → T, S → I, (A → V/G → L), o V → I, respectivamente.

41. El método de la reivindicación 36, en donde la mutación del aminoácido en la posición 205, 220 o 1450 de la proteína L es P → L, K → E, o L → I, respectivamente.

42. El método de la reivindicación 35, en donde la cepa del VSV se selecciona de la cepa Indiana o de la cepa New Jersey o del serotipo Isfahan u otros vesiculovirus.

43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, en donde la cepa del VSV contiene un ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno heterólogo.

44. El método de la reivindicación 43, en donde el antígeno heterólogo se obtiene de un microorganismo patógeno seleccionado del grupo que consiste de un virus, una bacteria, un protozoario y un hongo.

45. El método de la reivindicación 43, en donde el antígeno heterólogo se selecciona del grupo que consiste de un antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un antígeno HTLV, un antígeno SIV, un antígeno RSV, un antígeno PIV, un antígeno HSV, un antígeno CMV, un antígeno del virus Epstein-Barr, un antígeno del virus de la Varicela-Zoster, un antígeno del virus de las paperas, un antígeno del virus del sarampión, un antígeno del virus de la influenza, un antígeno de poliovirus, un antígeno de rinovirus, un antígeno del virus de la hepatitis A, un antígeno del virus de la hepatitis B, un antígeno del virus de la hepatitis C, un antígeno del virus Norwalk, un antígeno del togavirus, un antígeno de alfavirus, un antígeno del virus rubéola, un antígeno del virus de la rabia, un antígeno del virus Marburg, un antígeno del virus Ebola, un antígeno del virus papiloma, un antígeno del

virus polioma, un antígeno del metapneumovirus, un antígeno del coronavirus, un antígeno del *Vibrio Cholerae*, un antígeno del *Plasmodium falciparum*, un antígeno del *Plasmodium vivax*, un antígeno del *Plasmodium ovale*, un antígeno del *Plasmodium malariae*, un antígeno del *Plasmodium Knowlesi*, un antígeno del *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno del *Streptococcus pyogenes*, un antígeno del *Helicobacter pylori*, un antígeno del *Streptococcus agalactiae*, un antígeno del *Neisseria meningitidis*, un antígeno del *Neisseria gonorrhoeae*, un antígeno del *Corynebacterium diphteria*, un antígeno del *Clostridium tetani*, un antígeno del *Bordetella pertussis*, un antígeno del *Haemophilus*, un antígeno de *Chlamydia* y un antígeno del *Escherichia coli*.

46. El método de la reivindicación 43, en donde el antígeno heterólogo comprende una proteína VIH.

47. El método de la reivindicación 46, en donde la proteína VIH está codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste de *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* y *vpu*.

48. El método de la reivindicación 46, en donde la proteína VIH es una proteína VIH gag.

49. El método de la reivindicación 48, en donde la proteína VIH gag tiene por lo menos una mutación en la posición 165, 270, 329 o 348.

50. El método de la reivindicación 49, en donde la mutación del aminoácido en la posición 165, 270, 329 o 348 de la proteína VIH gag es S → G, L → S, D → N, o T → K, respectivamente.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con métodos para generar cepas genéticamente modificadas y atenuadas del virus de la estomatitis vesicular (VSV) para uso en la preparación de composiciones inmunogénicas. Más particularmente, la invención se relaciona con la identificación de modificaciones genéticas particulares del VSV atenuado que den como resultado un rendimiento creciente del virus y un incremento en la estabilidad del virus atenuado para la preparación de las composiciones inmunogénicas. También se describen los métodos para propagación del cultivo celular y el uso en producción a gran escala del VSV.

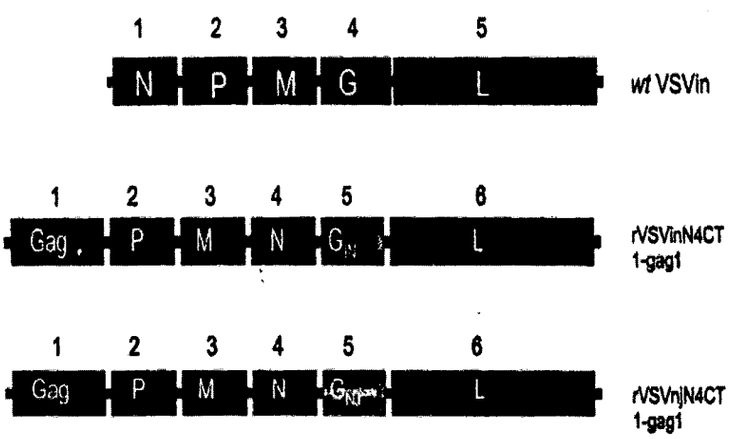

1
2
3
4
5
N
P
M
G
L
wt VSVin
1
2
3
4
5
6
Gag
P
M
N
L
rVSVinN4CT
1-gag1
1
2
3
4
5
6
Gag
P
M
N
L
rVSVnjN4CT
1-gag1

FIGURA 1

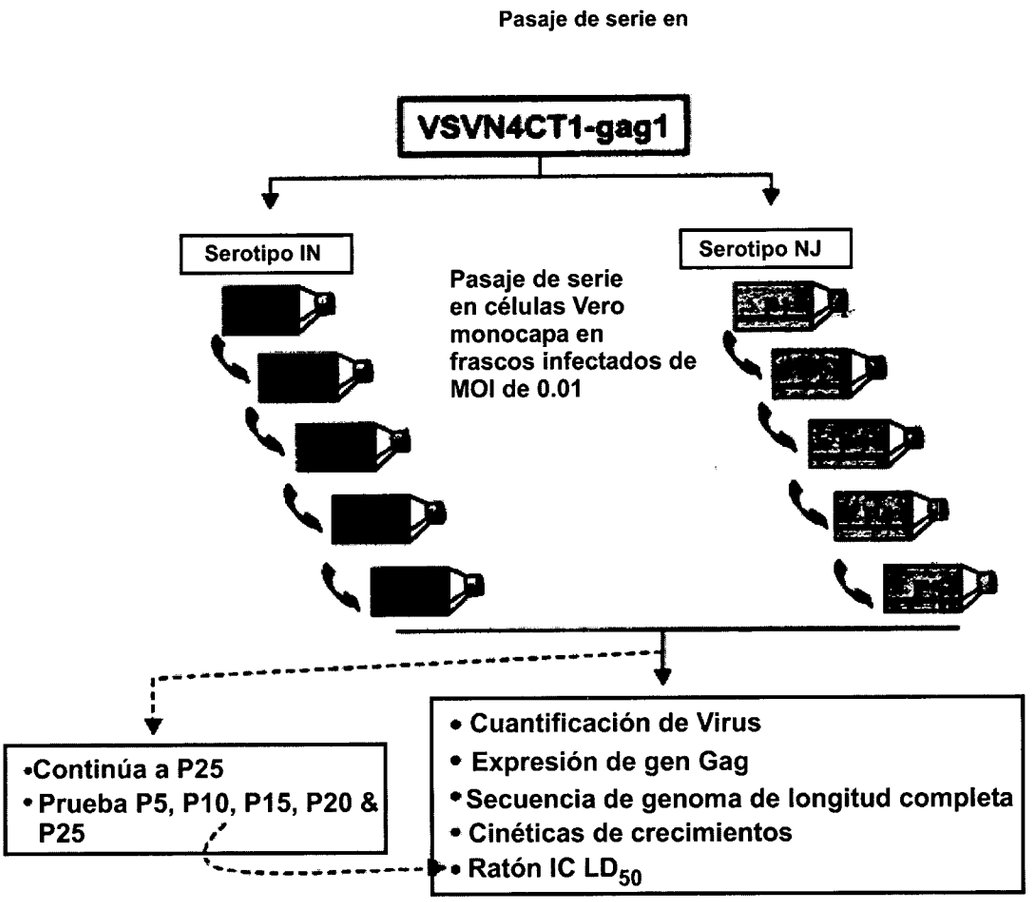
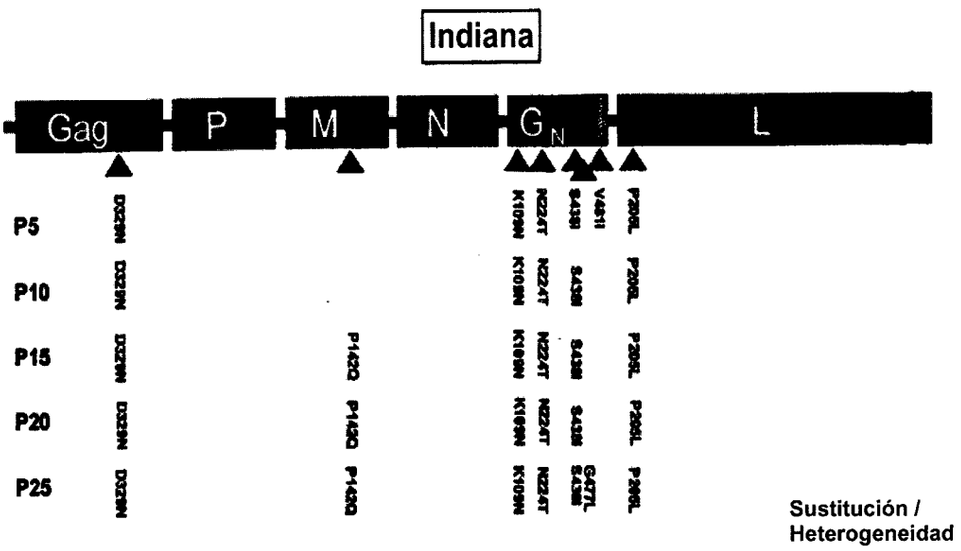

Pasaje de serie en
VSVN4CT1-gag1
Serotipo IN
Serotipo NJ
Pasaje de serie en células Vero monocapa en frascos infectados de MOI de 0.01
•Continúa a P25
• Prueba P5, P10, P15, P20 & P25
• Cuantificación de Virus
• Expresión de gen Gag
• Secuencia de genoma de longitud completa
• Cinéticas de crecimientos
• Ratón IC LD_{50}

FIGURA 2



- Todas las sustituciones P15 llevan toda la forma a P25
  - AtP25, una sustitución adicional aa se ve en aa 477 que se ubica dentro de la región (TM) de G

FIGURA 3

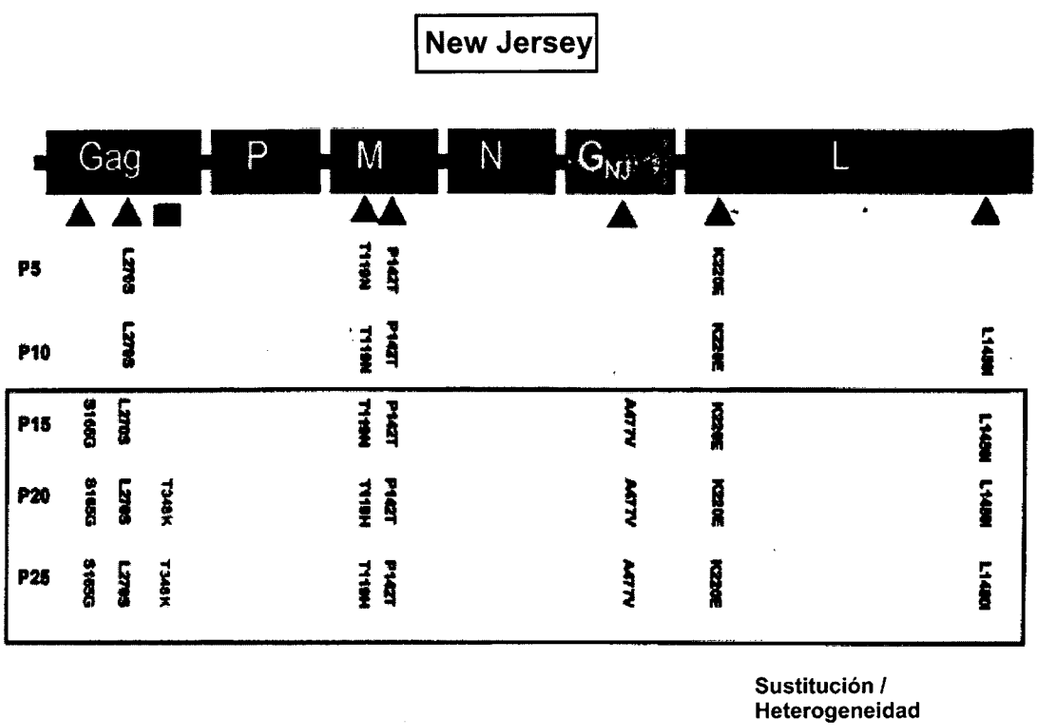
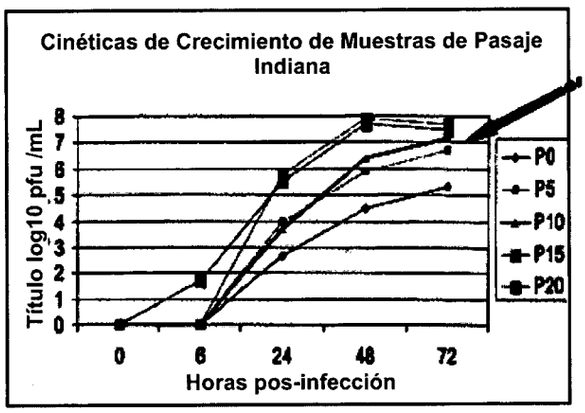

New Jersey
Gag
P
M
N
G NJ
L
P5
P10
P15
P20
P25
L270S
T116N
P142T
K229E
L1489I
S100G
S185G
T348K
A477V
Sustitución /
Heterogeneidad

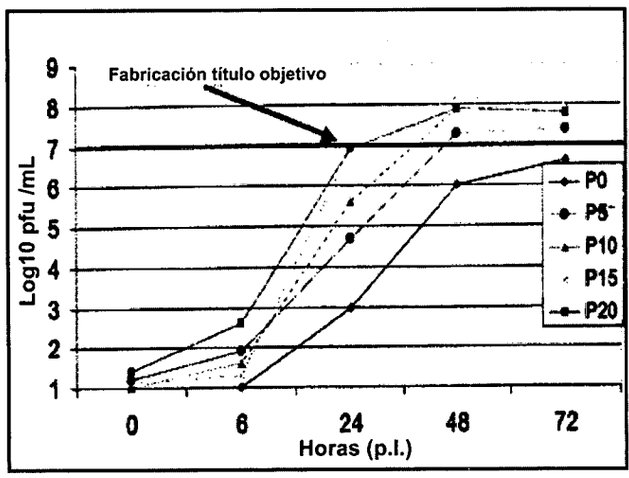
FIGURA 4



Fabricación de título objetivo

	Título Virus de Arco Log10 pfu /mL
P0	5.3
P5	6.7
P10	7.2
P15	7.7
P20	7.9

FIGURA 5



	Título de pico Log10 pfu /mL
P0	8.8
P5	7.4
P10	7.9
P15	8.2
P20	7.9

FIGURA 6

Protocolo

- Virus Probado
- Dosis / Ruta
- Animales: Ratones webster Suizos (10 ratones por grupo de prueba)
- Estudio indicado: Viernes
- terminación de estudio: Viernes

Informe de estado

- Todos los Títulos de retención están dentro de rangos aceptables
- No hay morbilidad o mortalidad en ningún grupo de prueba en ninguna dosis
- No hay cambios en Ld_{50} con virus pasados

(ver tabla a la derecha)

Resultados LD50	
Pasaje #	Ld50 en pfu
P0	$>10^7$
P15	$>10^7$
P20	$>10^7$
P25	$>10^7$

FIGURA 7

P25-VSV IND

Comparación de secuencias de amino ácido (AA) y de nucleótido (NT) de virus pasados y originales (P0), Las sustituciones NT y AA en los virus pasados se muestran en negrilla

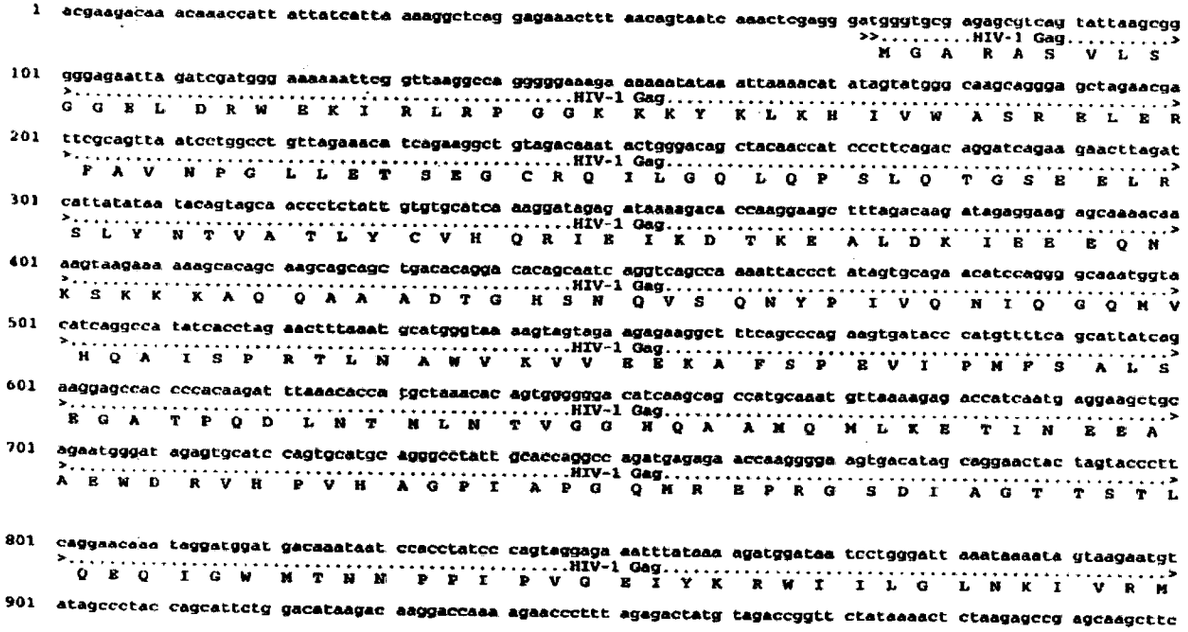


FIGURA 8A

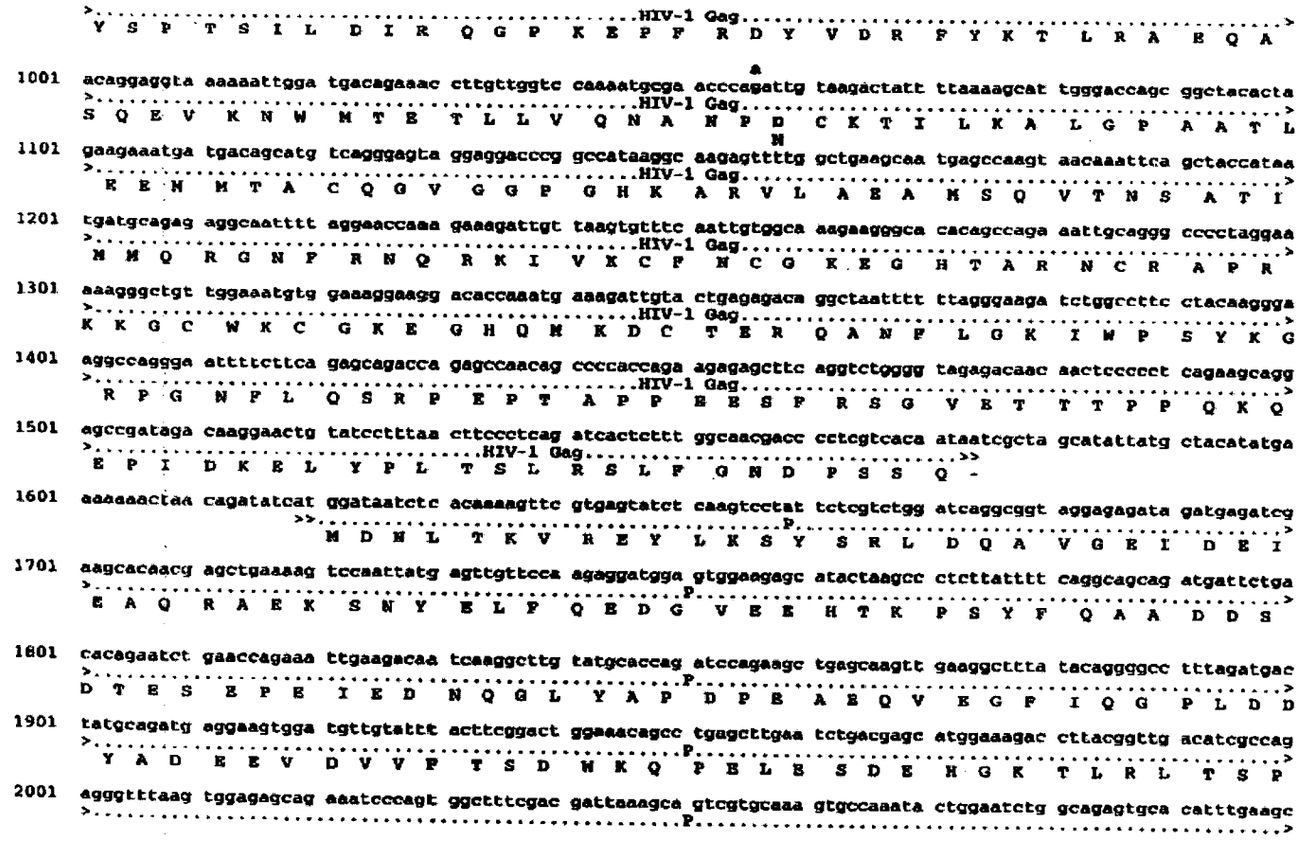

HIV-1 Gag
Y S P T S I L D I R Q G P K E P F R D Y V D R F Y K T L R A E Q A
1001 acaggaggta aaaaattgga tgacagaaac cttgttggtc caaaatgcga acccagattg taagactatt ttaaaagcat tgggaccagc ggctacacta
S Q E V K N W M T E T L L V Q N A N P D C K T I L K A L G P A A T L
1101 gaagaaatga tgacagcatg tcagggagta ggaggacccg gccataaggc aagagttttg gctgaagcaa tgagccaagt aacaaattca gctaccataa
E E M M T A C Q G V G G P G H K A R V L A E A M S Q V T N S A T I
1201 tgatgcagag aggcaatttt aggaaccaaa gaaagattgt taagtgtttc aattgtggca aagaagggca cacagccaga aattgcaggg ccctaggaa
M M Q R G N F R N Q R K I V K C F N C G K E G H T A R N C R A P R
1301 aaagggctgt tggaaatgtg gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga tctggccttc ctacaaggga
K K G C W K C G K E G H Q M K D C T E R Q A N F L G K I W P S Y K G
1401 aggccaggga attttcttca gagcagacca gagccaacag ccccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactccccct cagaagcagg
R P G N F L Q S R P E P T A P P E E S F R S G V E T T T P P Q K Q
1501 agccgataga caaggaactg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcaacgacc cctcgtcaca ataatcgcta gcatattatg ctacatatga
E P I D K E L Y P L T S L R S L F G N D P S S Q -
1601 aaaaaactaa cagatatcat ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcggt aggagagata gatgagatcg
M D M L T K V R E Y L K S Y S R L D Q A V G E I D E I
1701 aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga
E A Q R A E K S N Y E L P Q E D G V E E H T K P S Y F Q A A D D S
1801 cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc tgagcaagtt gaaggcttta tacaggggcc tttagatgac
D T E S E P E I E D N Q G L Y A P D P E A E Q V E G F I Q G P L D D
1901 tatgcagatg aggaagtgga tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac cttacggttg acatcgccag
Y A D E E V D V V F T S D W K Q P E L E S D E H G K T L R L T S P
2001 agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc

FIGURA 8B

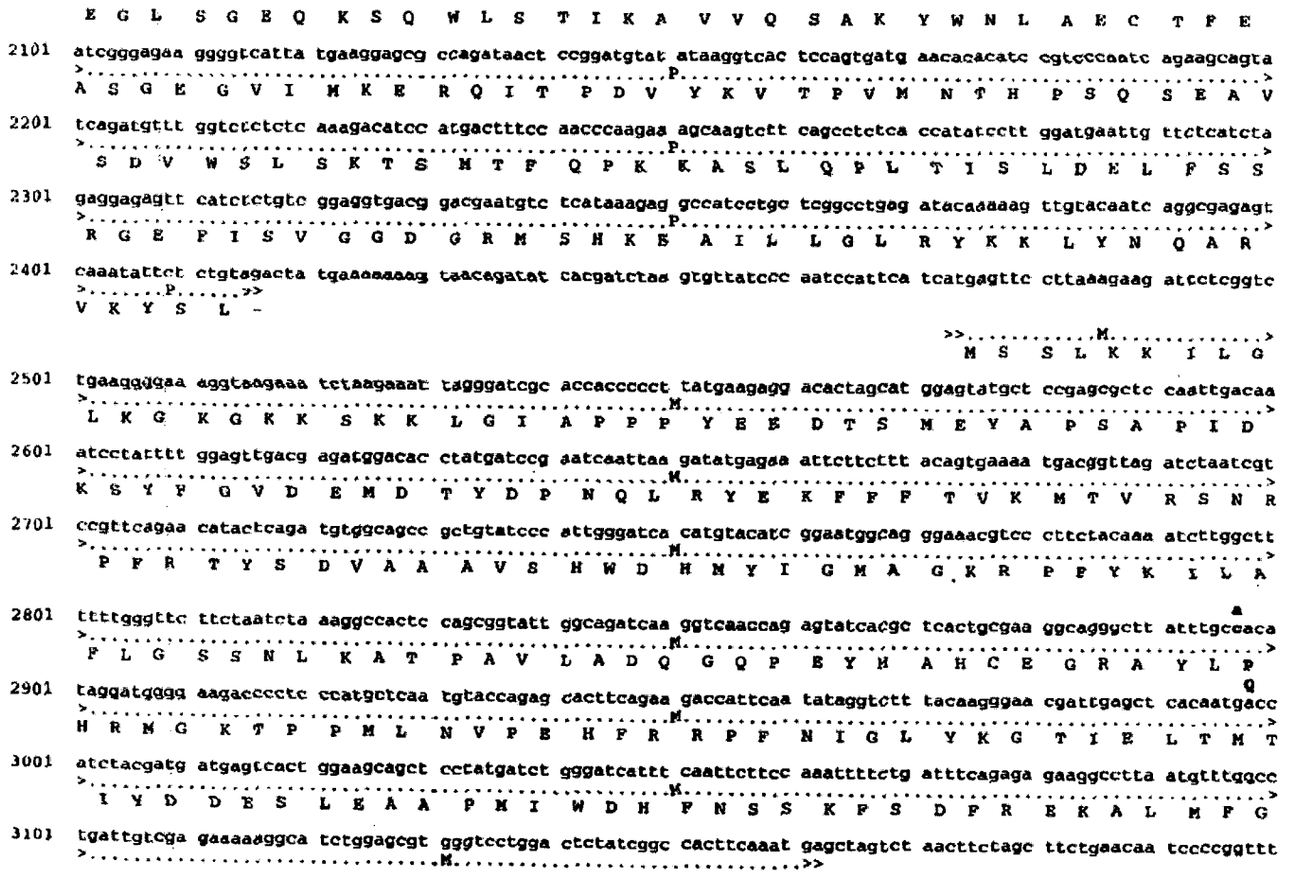

E G L S G E Q K S Q W L S T I K A V V Q S A K Y W N L A E C T F E
2101 atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta
A S G E G V I M K E R Q I T P D V Y K V T P V M N T H P S Q S E A V
2201 tcagatgttt ggtcrctctc aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt ggatgaattg ttctcatcta
S D V W S L S K T S M T F Q P K K A S L Q P L T I S L D E L F S S
2301 gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt
R G E F I S V G G D G R M S H K E A I L L G L R Y K K L Y N Q A R
2401 caaatatttct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc aatccattca tcatgagttc cttaaagaag atcctcggtc
V K Y S L -
M S S L K K I L G
2501 tgaaggggaa aggtaagaaa tctaagaaat tagggatcgc accacccccc tatgaagagg acactagcat ggagtatgct ccgagcgctc caattgacaa
L K G K G K K S K K L G I A P P P Y E E D T S M E Y A P S A P I D
2601 atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt
K S Y F G V D E M D T Y D P N Q L R Y E K F F F T V K M T V R S N R
2701 ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt
P F R T Y S D V A A A V S H W D H M Y I G M A G K R P F Y K I L A
2801 ttttgggttc ttctaatcta aaggccactc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa ggcagggctt atttgccaca
F L G S S N L K A T P A V L A D Q G Q P E Y H A H C E G R A Y L P
2901 taggatgggg aagaccccta ccatgctcaa tgtaccagag cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc
H R M G K T P P M L N V P E H F R R P F N I G L Y K G T I E L T M T
3001 atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc aaatttttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc
I Y D D E S L E A A P M I W D H F N S S K F S D F R E K A L M F G
3101 tgattgtcga gaaaaaggca tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc ttctgaacaa tccccggttt

FIGURA 8C

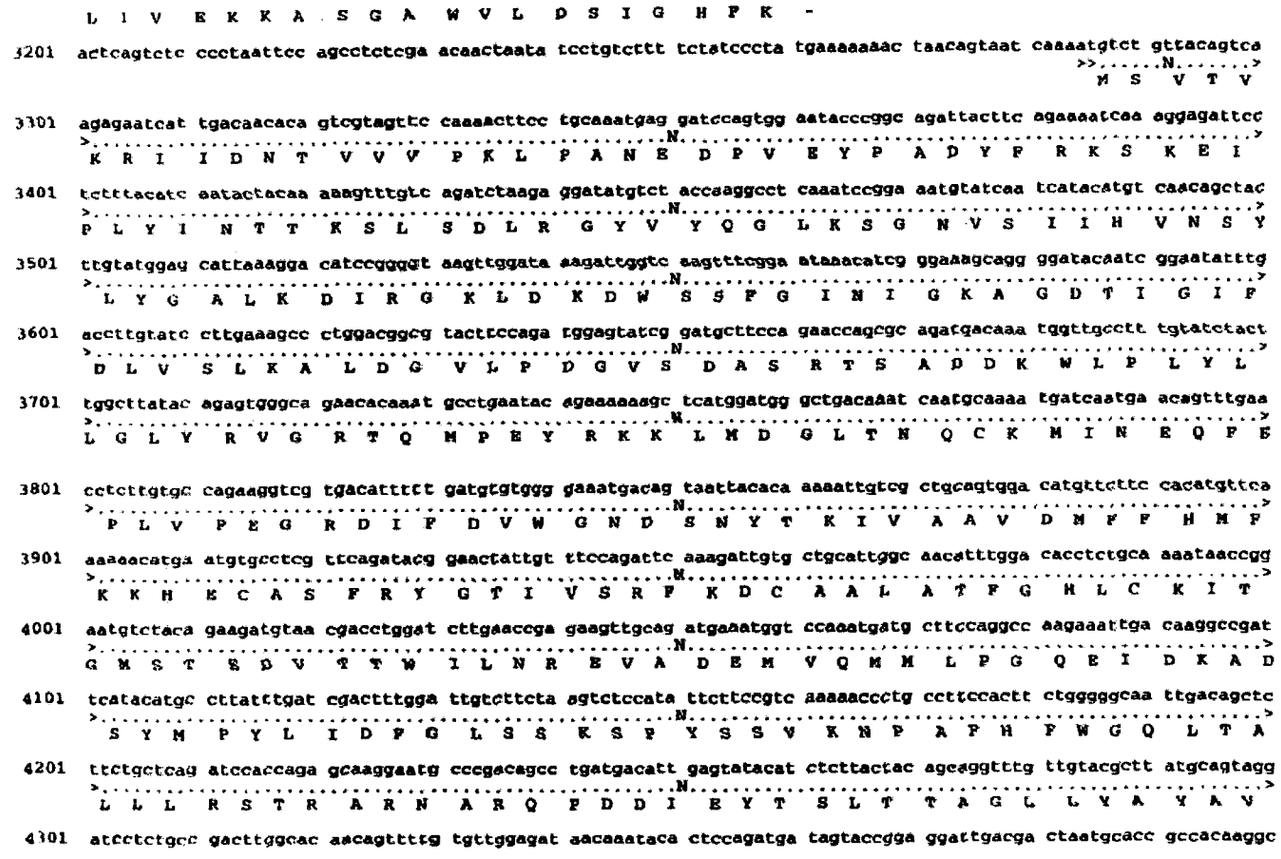

L I V E K K A S G A W V L D S I G H F K -
3201 actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca
>>.....N.....>
M S V T V
3301 agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc
>.....N.....>
K R I I D N T V V V P K L P A N E D P V E Y P A D Y F R K S K E I
3401 tctttacatc aatactacaa aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa tcatacatgt caacagctac
>.....N.....>
P L Y I N T T K S L S D L R G Y V Y Q G L K S G N V S I I H V N S Y
3501 ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg
>.....N.....>
L Y G A L K D I R G K L D K D W S S F G I N I G K A G D T I G I F
3601 accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact
>.....N.....>
D L V S L K A L D G V L P D G V S D A S R T S A D D K W L P L Y L
3701 tggcttatac agagtgggca gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa tgatcaatga acagtttgaa
>.....N.....>
L G L Y R V G R T Q M P E Y R K K L M D G L T N Q C K M I N E Q F E
3801 cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca
>.....N.....>
P L V P E G R D I F D V W G N D S N Y T K I V A A V D M F F H M F
3901 aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg
>.....N.....>
K K H E C A S F R Y G T I V S R F K D C A A L A T F G H L C K I T
4001 aatgtctaca gaagatgtaa cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc aagaaattga caaggccgat
>.....N.....>
G M S T S D V T T W I L N R E V A D E M V Q M M L P G Q E I D K A D
4101 tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc
>.....N.....>
S Y M P Y L I D P G L S S K S P Y S S V K N P A F H F W G Q L T A
4201 ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg
>.....N.....>
L L L R S T R A R N A R Q F D D I E Y T S L T T A G L L Y A Y A V
4301 atcctctgcc gacttggcac aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga ctaatgcacc gccacaaggc

FIGURA 8D

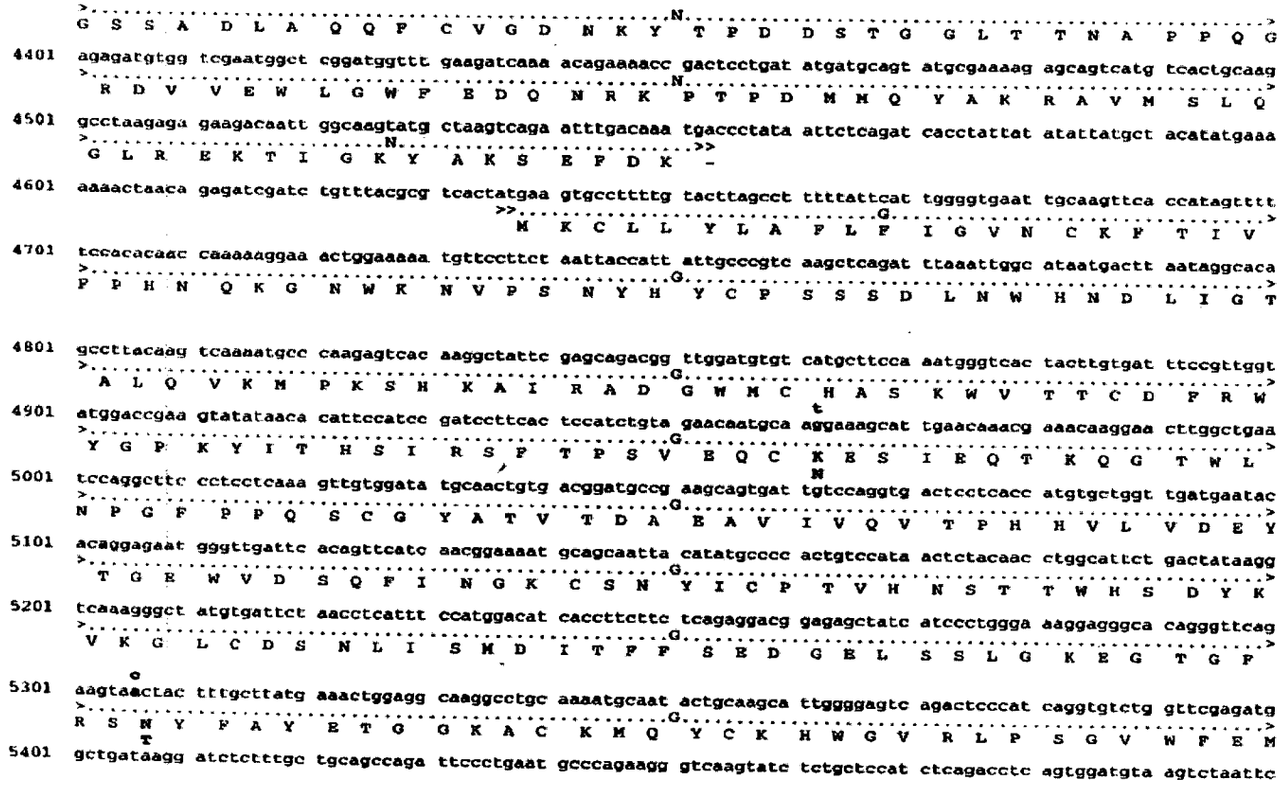

G S S A D L A Q Q F C V G D N K Y T P D D S T G G L T T N A P P Q G
4401 agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag
R D V V E W L G W F E D Q N R K P T P D M M Q Y A K R A V M S L Q
4501 gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata attctcagat cacctattat atattatgct acatatgaaa
G L R E K T I G K Y A K S E F D K -
4601 aaaactaaca gagatcgatc tgtttacgcg tcactatgaa gtgccttttg tacttagcct ttttattcat tggggtgaat tgcaagttca ccatagtttt
M K C L L Y L A F L F I G V N C K F T I V
4701 tccacacaac caaaaaggaa actggaaaaa tgttccttct aattaccatt attgcccgtc aagctcagat ttaaattggc ataatgactt aataggcaca
P P H N Q K G N W K N V P S N Y H Y C P S S S D L N W H N D L I G T
4801 gccttacaag tcaaaatgcc caagagtcac aaggctattc gagcagacgg ttggatgtgt catgcttcca aatgggtcac tacttgtgat ttccgttggt
A L Q V K M P K S H K A I R A D G W M C H A S K W V T T C D F R W
4901 atggaccgaa gtatataaca cattccatcc gatccttcac tccatctgta gaacaatgca aggaaagcat tgaacaaacg aaacaaggaa cttggctgaa
Y G P K Y I T H S I R S F T P S V E Q C K E S I E Q T K Q G T W L
5001 tccaggcttc cctcctcaaa gttgtggata tgcaactgtg acggatgccg aagcagtgat tgtccaggtg actcctcacc atgtgctggt tgatgaatac
N P G F P P Q S C G Y A T V T D A E A V I V Q V T P H H V L V D E Y
5101 acaggagaat gggttgattc acagttcatc aacggaaaat gcagcaatta catatgcccc actgtccata actctacaac ctggcattct gactataagg
T G E W V D S Q F I N G K C S N Y I C P T V H N S T T W H S D Y K
5201 tcaaagggct atgtgattct aacctcattt ccatggacat caccttcttc tcagaggacg gagagctatc atccctggga aaggagggca cagggttcag
V K G L C D S N L I S M D I T F F S E D G E L S S L G K E G T G F
5301 aagtaactac tttgcttatg aaactggagg caaggcctgc aaaatgcaat actgcaagca ttggggagtc agactcccat caggtgtctg gttcgagatg
R S N Y F A Y E T G G K A C K M Q Y C K H W G V R L P S G V W F E M
5401 gctgataagg atctctttgc tgcagccaga ttccctgaat gcccagaagg gtcaagtatc tctgctccat ctcagacctc agtggatgta agtctaattc

FIGURA 8E

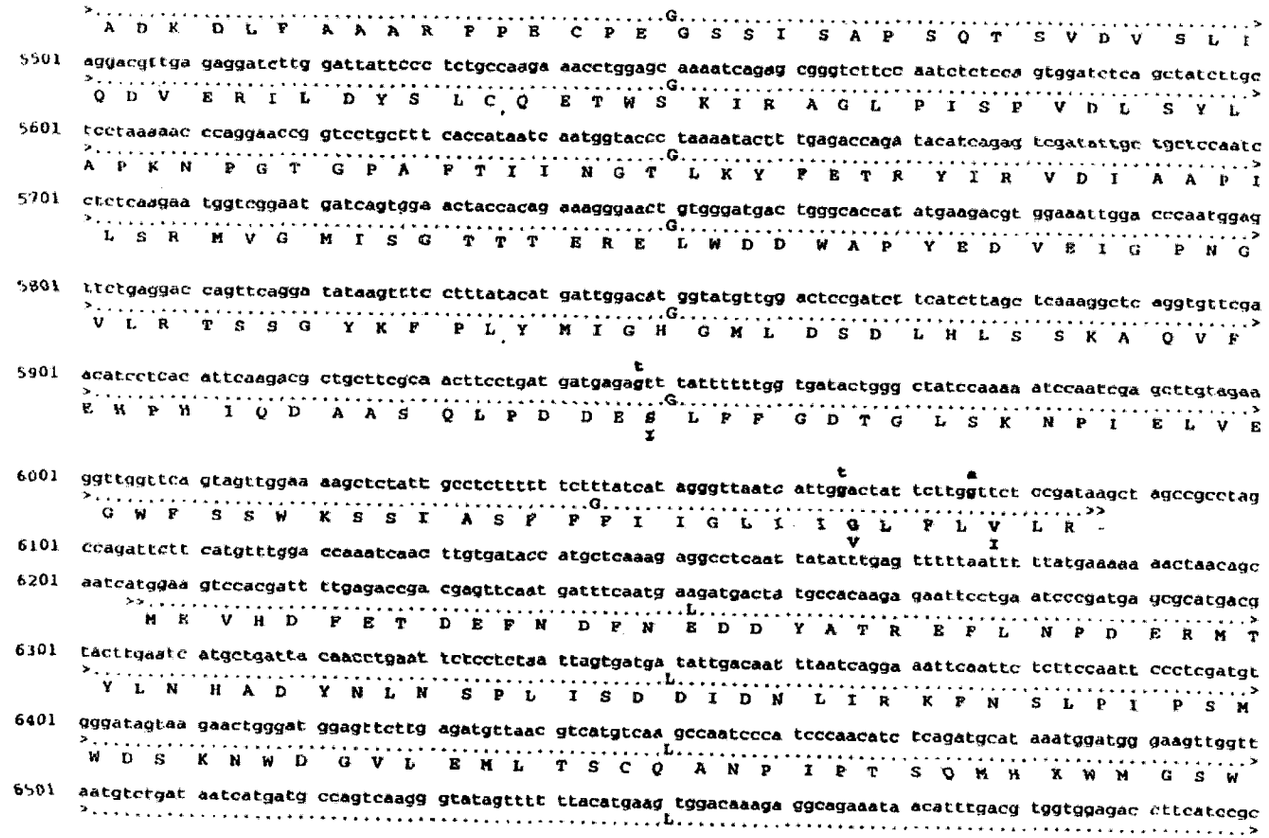


FIGURA 8F

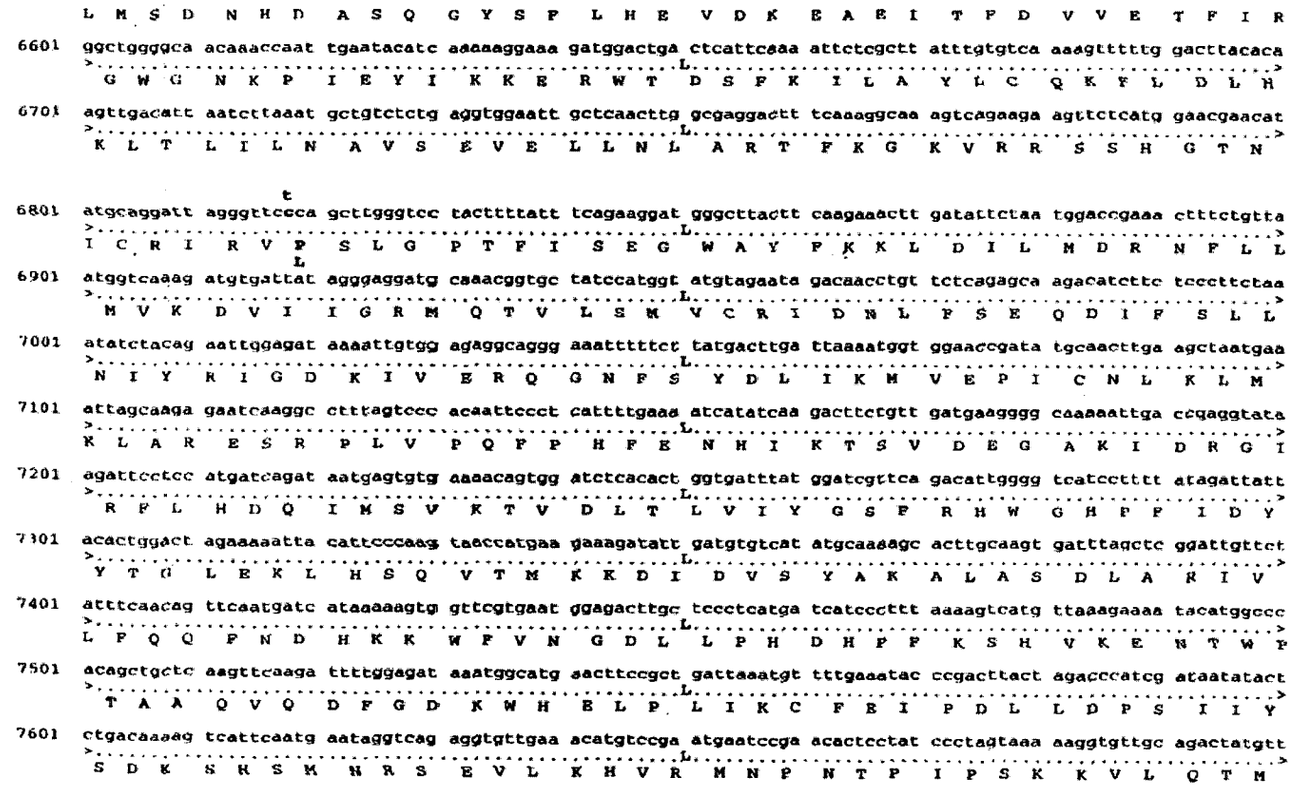

L M S D N H D A S Q G Y S F L H E V D K E A E I T F D V V E T F I R
6601 ggctggggca acaaaccaat tgaatacatc aaaaaggaaa gatggactga ctcattcaaa attctcgctt atttgtgtca aaagtttttg gacttacaca
G W G N K P I E Y I K K E R W T D S F K I L A Y L C Q K F L D L H
6701 agttgacatt aatcttaaat gctgtctctg aggtggaatt gctcaacttg gcgaggactt tcaaaggcaa agtcagaaga agttctcatg gaacgaacat
K L T L I L N A V S E V E L L N L A R T F K G K V R R S S H G T N
6801 atgcaggatt agggttccca gcttgggtcc tacttttatt tcagaaggat gggcttactt caagaaactt gatattctaa tggaccgaaa ctttctgtta
I C R I R V P S L G P T F I S E G W A Y F K K L D I L M D R N F L L
6901 atggtcaaag atgtgattat agggaggatg caaacggtgc tatccatggt atgtagaata gacaacctgt tctcagagca agacatcttc tcccttctaa
M V K D V I I G R M Q T V L S M V C R I D N L P S E Q D I F S L L
7001 atatctacag aattggagat aaaattgtgg agaggcaggg aaatttttct tatgacttga ttaaaatggt ggaaccgata tgcaacttga agctaatgaa
N I Y R I G D K I V E R Q G N F S Y D L I K M V E P I C N L K L M
7101 attagcaaga gaatcaaggc ctttagtccc acaattccct cattttgaaa atcatatcaa gacttctgtt gatgaagggg caaaaattga ccgaggtata
K L A R E S R P L V P Q F P H F E N H I K T S V D E G A K I D R G I
7201 agattcctcc atgatcagat aatgagtgtg aaaacagtgg atctcacact ggtgatttat ggatcgttca gacattgggg tcatcctttt atagattatt
R F L H D Q I M S V K T V D L T L V I Y G S F R H W G H F F I D Y
7301 acactggact agaaaaatta cattcccaag taaccatgaa gaaagatatt gatgtgtcat atgcaaaagc acttgcaagt gatttagctc ggattgttct
Y T G L E K L H S Q V T M K K D I D V S Y A K A L A S D L A R I V
7401 atttcaacag ttcaatgatc ataaaaagtg gttcgtgaat ggagacttgc tccctcatga tcatcccttt aaaagtcatg ttaaagaaaa tacatggccc
L F Q Q F N D H K K W F V N G D L L P H D H F F K S H V K E N T W P
7501 acagctgctc aagttcaaga ttttggagat aaatggcatg aactttcgct gattaaatgt tttgaaatac ccgacttact agacccatcg ataatatact
T A A Q V Q D F G D K W H E L P L I K C F E I P D L L D P S I I Y
7601 ctgacaaaag tcattcaatg aataggtcag aggtgttgaa acatgtccga atgaatccga acactcctat ccctagtaaa aaggtgttgc agactatgtt
S D K S R S M N R S E V L K H V R M N P N T P I P S K K V L Q T M

FIGURA 8G

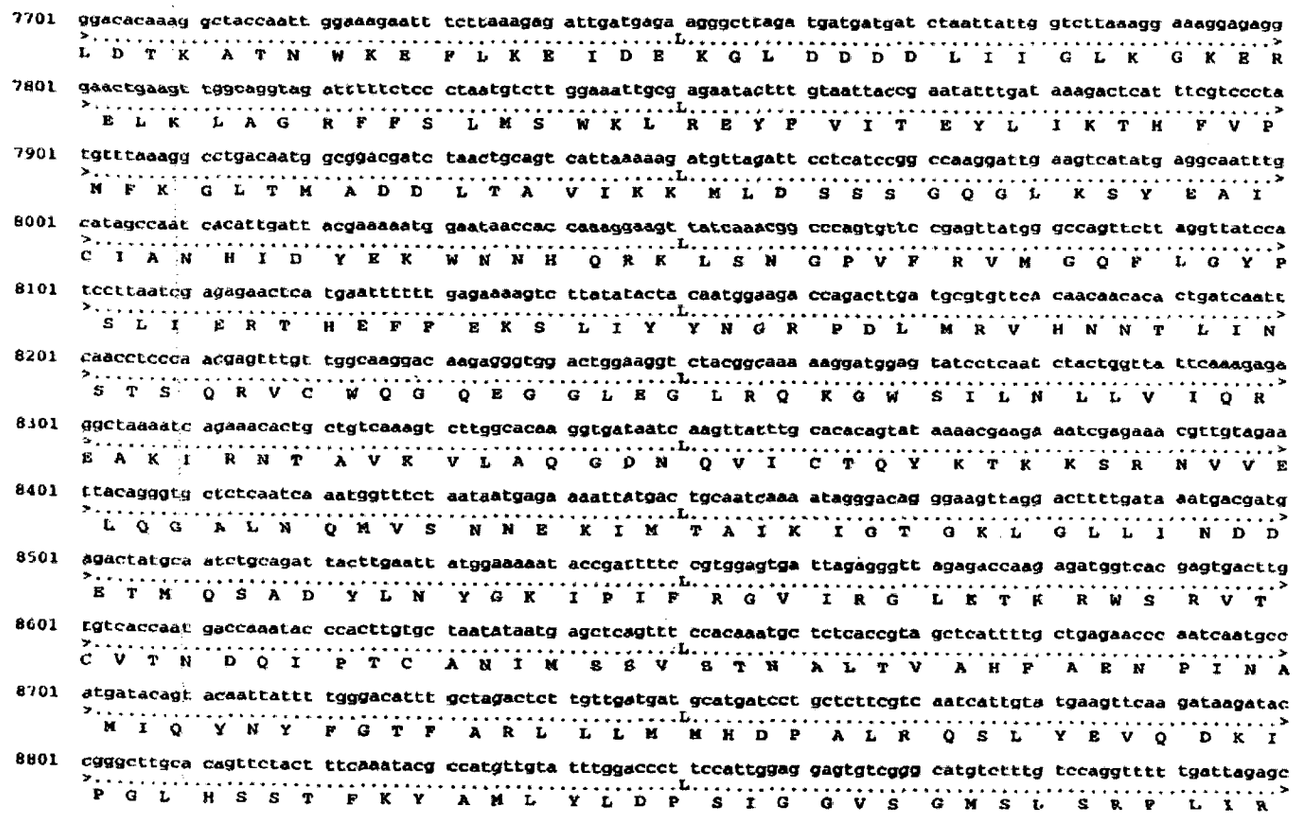

7701 ggacacaaag gctaccaatt ggaaagaatt tcttaaagag attgatgaga agggcttaga tgatgatgat ctaattattg gtcttaaagg aaaggagagg
L D T K A T N W K E F L K E I D E K G L D D D D L I I G L K G K E R
7801 gaactgaagt tggcaggtag atttttctcc ctaatgtctt ggaaattgcg agaatacttt gtaattaccg aatatttgat aaagactcat ttcgtcccta
E L K L A G R F F S L M S W K L R E Y F V I T E Y L I K T H F V P
7901 tgtttaaagg cctgacaatg gcggacgatc taactgcagt cattaaaaag atgttagatt cctcatccgg ccaaggattg aagtcatatg aggcaatttg
M F K G L T M A D D L T A V I K K M L D S S S G Q G L K S Y E A I
8001 catagccaat cacattgatt acgaaaaatg gaataaccac caaaggaagt tatcaaacgg cccagtgttc cgagttatgg gccagttctt aggttatcca
C I A N H I D Y E K W N N H Q R K L S N G P V F R V M G Q F L G Y P
8101 tccttaatcg agagaactca tgaatttttt gagaaaagtc ttatatacta caatggaaga ccagacttga tgcgtgttca caacaacaca ctgatcaatt
S L I E R T H E F F E K S L I Y Y N G R P D L M R V H N N T L I N
8201 caacctccca acgagtttgt tggcaaggac aagagggtgg actggaaggt ctacggcaaa aaggatggag tatcctcaat ctactggtta ttcaaagaga
S T S Q R V C W Q G Q E G G L E G L R Q K G W S I L N L L V I Q R
8301 ggctaaaatc agaaacactg ctgtcaaagt cttggcacaa ggtgataatc aagttatttg cacacagtat aaaacgaaga aatcgagaaa cgttgtagaa
E A K I R N T A V K V L A Q G D N Q V I C T Q Y K T K K S R N V V E
8401 ttacagggtg ctctcaatca aatggtttct aataatgaga aaattatgac tgcaatcaaa atagggacag ggaagttagg acttttgata aatgacgatg
L Q G A L N Q M V S N N E K I M T A I K I G T G K L G L L I N D D
8501 agactatgca atctgcagat tacttgaatt atggaaaaat accgattttc cgtggagtga ttagaggggtt agagaccaag agatggtcac gagtgacttg
E T M Q S A D Y L N Y G K I P I F R G V I R G L E T K R W S R V T
8601 tgtcaccaat gaccaaatac ccacttgtgc taatataatg agctcagttt ccacaaatgc tctcaccgta gctcattttg ctgagaaccc aatcaatgcc
C V T N D Q I P T C A N I M S S V S T N A L T V A H F A E N P I N A
8701 atgatacagt acaattattt tgggacattt gctagactct tgttgatgat gcatgatcct gctcttcgtc aatcattgta tgaagttcaa gataagatac
M I Q Y N Y F G T F A R L L L M M H D P A L R Q S L Y E V Q D K I
8801 cgggcttgca cagttctact ttcaaatacg ccatgttgta tttggaccct tccattggag gagtgtcggg catgtctttg tccaggtttt tgattagagc
P G L H S S T F K Y A M L Y L D P S I G G V S G M S L S R F L I R

FIGURA 8H

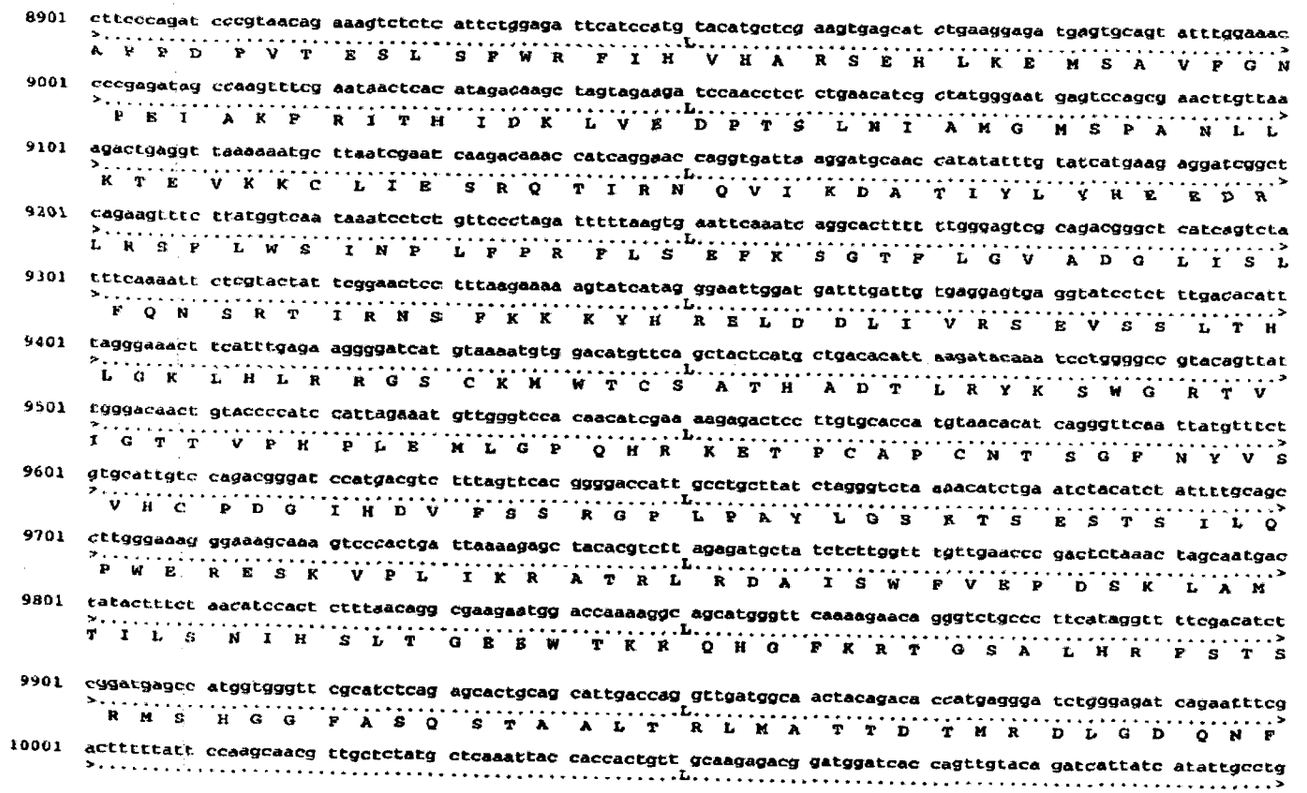

8901 cttcccagat cccgtaacag aaagtctctc attctggaga ttcatccatg tacatgctcg aagtgagcat ctgaaggaga tgagtgcagt atttggaaac
A F P D P V T E S L S F W R F I H V H A R S E H L K E M S A V P G N
9001 cccgagatag ccaagtttcg aataactcac atagacaagc tagtagaaga tccaacctct ctgaacatcg ctatgggaat gagtccagcg aacttgttaa
P E I A K P R I T H I D K L V E D P T S L N I A M G M S P A N L L
9101 agactgaggt taaaaaatgc ttaatcgaat caagacaaac catcaggaac caggtgatta aggatgcaac catatatttg tatcatgaag aggatcggct
K T E V K K C L I E S R Q T I R N Q V I K D A T I Y L Y R E E D R
9201 cagaagtttc ttatggtcaa taaatcctct gttccctaga tttttaagtg aattcaaatc aggcactttt ttgggagtcg cagacgggct catcagtcta
L R S F L W S I N P L F P R F L S E F K S G T P L G V A D G L I S L
9301 tttcaaaatt ctcgtactat tcggaactcc tttaggaaaa agtatcatag ggaattggat gatttgattg tgaggagtga ggtatcctct ttgacacatt
F Q N S R T I R N S F K K K Y H R E L D D L I V R S E V S S L T H
9401 tagggaaact tcatttgaga aggggatcat gtaaaatgtg gacatgttca gctactcatg ctgacacatt aagatacaaa tcctggggcc gtacagttat
L G K L H L R R G S C K M W T C S A T H A D T L R Y K S W G R T V
9501 tgggacaact gtaccccatc cattagaaat gttgggtcca caacatcgaa aagagactcc ttgtgcacca tgtaacacat cagggttcaa ttatgtttct
I G T T V P H P L E M L G P Q H R K E T P C A P C N T S G F N Y V S
9601 gtgcattgtc cagacgggat ccatgacgtc tttagttcac ggggaccatt gcctgcttat ctagggtcta aaacatctga atctacatct attttgcagc
V H C P D G I H D V F S S R G P L P A Y L G S R T S E S T S I L Q
9701 cttgggaaag ggaaagcaaa gtcccactga ttaaaagagc tacacgtctt agagatgcta tctcttggtt tgttgaaccc gactctaaac tagcaatgac
P W E R E S K V P L I K R A T R L R D A I S W F V E P D S K L A M
9801 tatactttct aacatccact ctttaacagg cgaagaatgg accaaaaggc agcatgggtt caaaagaaca gggtctgccc ttcataggtt ttcgacatct
T I L S N I H S L T G E E W T K R Q H G F K R T G S A L H R F S T S
9901 cggatgagcc atggtgggtt cgcatctcag agcactgcag cattgaccag gttgatggca actacagaca ccatgaggga tctgggagat cagaatttcg
R M S H G G F A S Q S T A A L T R L M A T T D T M R D L G D Q N F
10001 acttttatt ccaagcaacg ttgctctatg ctcaaattac caccactgtt gcaagagacg gatggatcac cagttgtaca gatcattatc atattgcctg

FIGURA 8I

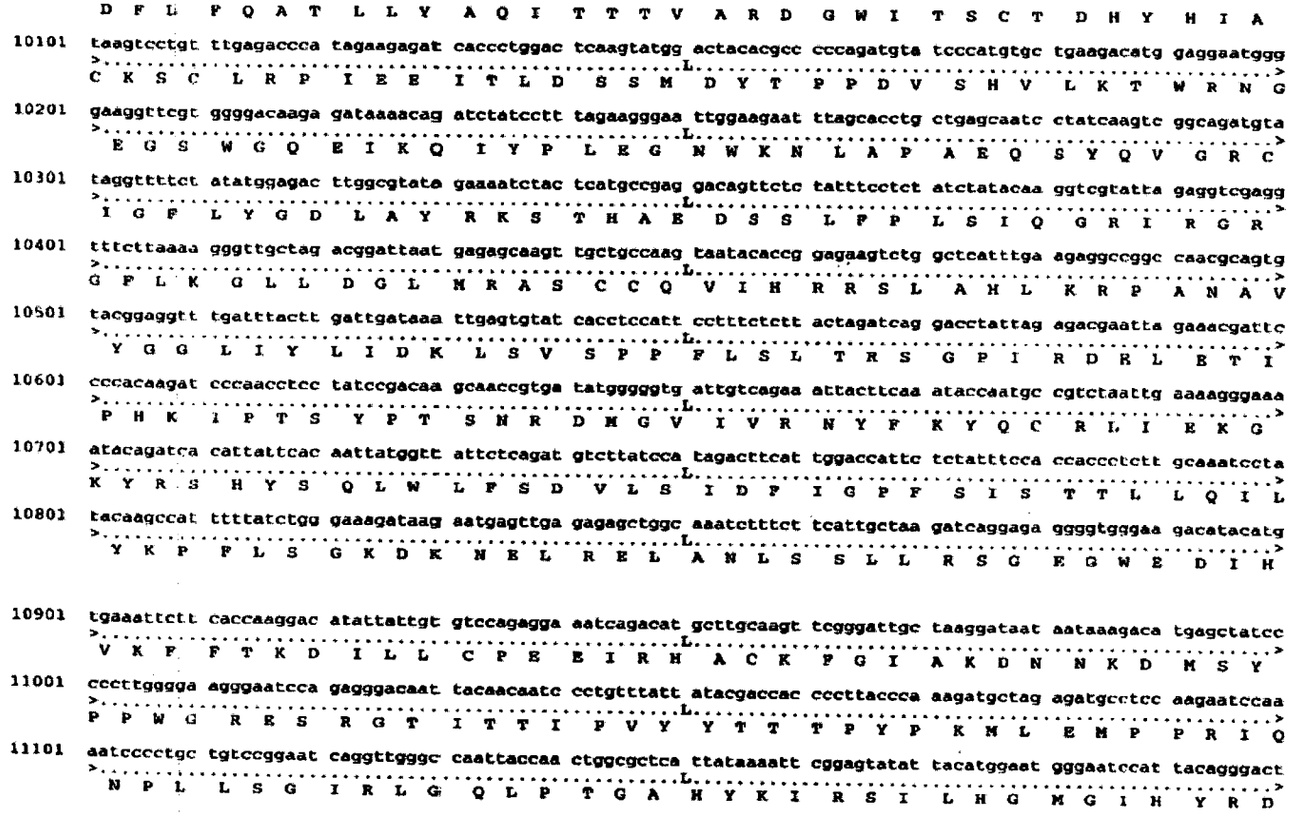

D F L F Q A T L L Y A Q I T T T V A R D G W I T S C T D H Y H I A
10101 taagtcctgt ttgagaccca tagaagagat caccctggac tcaagtatgg actacacgcc cccagatgta tcccatgtgc tgaagacatg gaggaatggg
C K S C L R P I E E I T L D S S M D Y T P P D V S H V L K T W R N G
10201 gaaggttcgt ggggacaaga gataaaacag atctatcctt tagaagggaa ttggaagaat ttagcacctg ctgagcaatc ctatcaagtc ggcagatgta
E G S W G Q E I K Q I Y P L E G N W K N L A P A E Q S Y Q V G R C
10301 taggttttct atatggagac ttggcgtata gaaaatctac tcatgccgag gacagttctc tatttcctct atctatacaa ggtcgtatta gaggtcgagg
I G F L Y G D L A Y R K S T H A E D S S L F P L S I Q G R I R G R
10401 tttcttaaaa gggttgctag acggattaat gagagcaagt tgctgccaag taatacaccg gagaagtctg gctcatttga agaggccggc caacgcagtg
G F L K G L L D G L M R A S C C Q V I H R R S L A H L K R P A N A V
10501 tacggaggtt tgatttactt gattgataaa ttgagtgtat cacctccatt cctttctctt actagatcag gacctattag agacgaatta gaaacgattc
Y G G L I Y L I D K L S V S P P F L S L T R S G P I R D R L E T I
10601 cccacaagat cccaacctcc tatccgacaa gcaaccgtga tatgggggtg attgtcagaa attacttcaa ataccaatgc cgtctaattg aaaagggaaa
P H K I P T S Y P T S N R D M G V I V R N Y F K Y Q C R L I E K G
10701 atacagatca cattattcac aattatggtt attctcagat gtcttatcca tagacttcat tggaccattc tctatttcca ccacctctt gcaaatccta
K Y R S H Y S Q L W L F S D V L S I D F I G P F S I S T T L L Q I L
10801 tacaagccat ttttatctgg gaaagataag aatgagttga gagagctggc aaatctttct tcattgctaa gatcaggaga ggggtgggaa gacatacatg
Y K P F L S G K D K N E L R E L A N L S S L L R S G E G W E D I H
10901 tgaaattctt caccaaggac atattattgt gtccagagga aatcagacat gcttgcaagt tcgggattgc taaggataat aataaagaca tgagctatcc
V K F F T K D I L L C P E E I R H A C K F G I A K D N N K D M S Y
11001 cccttgggga agggaatcca gagggacaat tacaacaatc cctgtttatt atacgaccac cccttaccca aagatgctag agatgcctcc aagaatccaa
P P W G R E S R G T I T T I F V Y Y T T T P Y P K M L E M P P R I Q
11101 aatcccctgc tgtccggaat caggttgggc caattaccaa ctggcgctca ttataaaatt cggagtatat tacatggaat gggaatccat tacagggact
N P L L S G I R L G Q L P T G A H Y K I R S I L H G M G I H Y R D

FIGURA 8J

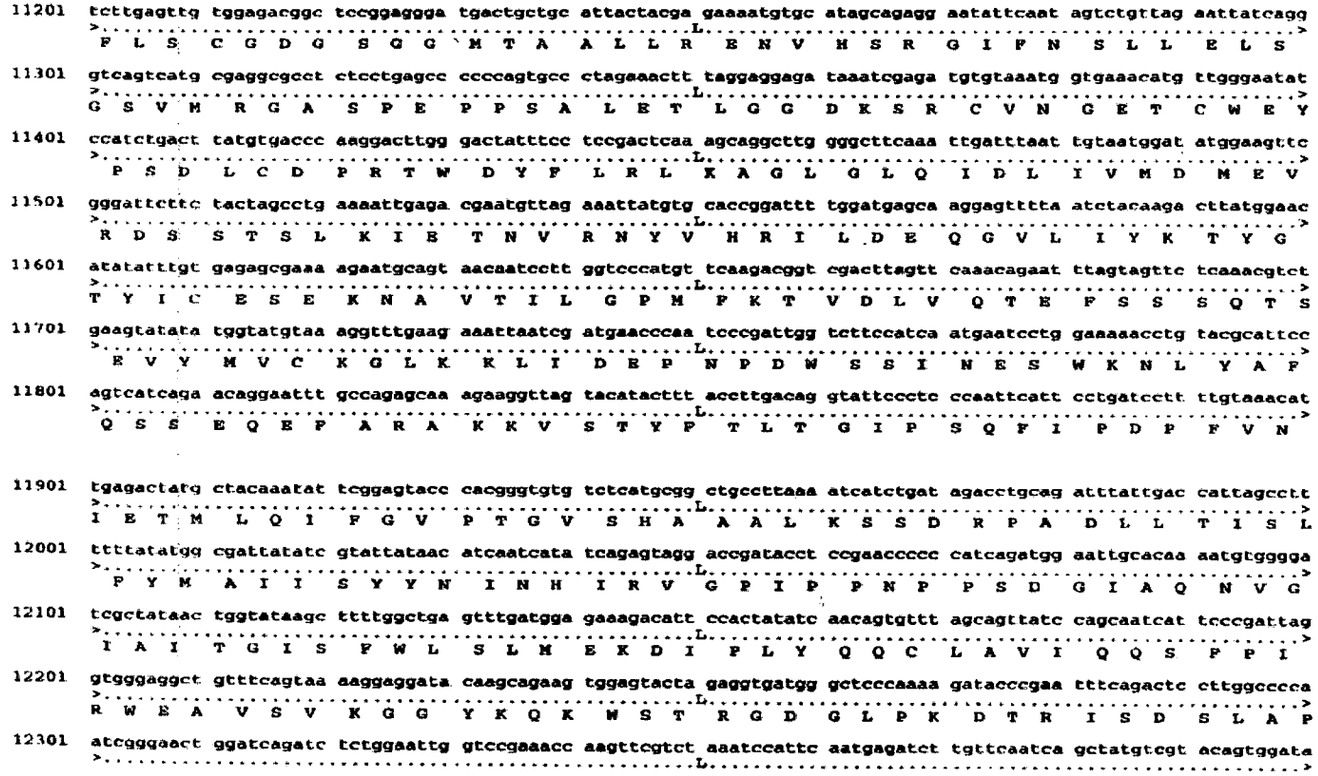

11201 tcttgagttg tggagacggc tccggaggga tgactgctgc attactacga gaaaatgtgc atagcagagg aatattcaat agtctgttag aattatcagg
F L S C G D G S G G M T A A L L R E N V H S R G I F N S L L E L S
11301 gtcagtcatg cgaggcgcct ctcctgagcc ccccagtgcc ctagaaactt taggaggaga taaatcgaga tgtgtaaatg gtgaaacatg ttgggaatat
G S V M R G A S P E P P S A L E T L G G D K S R C V N G E T C W E Y
11401 ccatctgact tatgtgaccc aaggacttgg gactatttcc tccgactcaa agcaggcttg gggcttcaaa ttgatttaat tgtaatggat atggaagttc
P S D L C D P R T W D Y F L R L K A G L G L Q I D L I V M D M E V
11501 gggattcttc tactagcctg aaaattgaga cgaatgttag aaattatgtg caccggattt tggatgagca aggagtttta atctacaaga cttatggaac
R D S S T S L K I E T N V R N Y V H R I L D E Q G V L I Y K T Y G
11601 atatatttgt gagagcgaaa agaatgcagt aacaatcctt ggtcccatgt tcaagacggt cgacttagtt caaacagaat ttagtagttc tcaaacgtct
T Y I C E S E K N A V T I L G P M F K T V D L V Q T E F S S S Q T S
11701 gaagtatata tggtatgtaa aggtttgaag aaatttaatcg atgaacccaa tcccgattgg tcttccatca atgaatcctg gaaaaacctg tacgcattcc
E V Y M V C K G L K K L I D E P N P D W S S I N E S W K N L Y A F
11801 agtcatcaga acaggaattt gccagagcaa agaaggttag tacatacttt accttgacag gtattcctc ccaattcatt cctgatcctt ttgtaaacat
Q S S E Q E F A R A K K V S T Y P T L T G I P S Q F I P D P F V N
11901 tgagactatg ctacaaatat tcggagtacc cacgggtgtg tctcatgcgg ctgccttaaa atcatctgat agacctgcag atttattgac cattagcctt
I E T M L Q I F G V P T G V S H A A A L K S S D R P A D L L T I S L
12001 ttttatatgg cgattatatc gtattataac atcaatcata tcagagtagg accgatacct ccgaacccc catcagatgg aattgcacaa aatgtgggga
P Y M A I I S Y Y N I N H I R V G P I P P N P P S D G I A Q N V G
12101 tcgctataac tggtataagc ttttggctga gtttgatgga gaaagacatt ccactatatc aacagtgttt agcagttatc cagcaatcat tcccgattag
I A I T G I S F W L S L M E K D I P L Y Q Q C L A V I Q Q S P P I
12201 gtgggaggct gtttcagtaa aaggaggata caagcagaag tggagtacta gaggtgatgg gctcccaaaa gatacccgaa tttcagactc cttggcccca
R W E A V S V K G G Y K Q K W S T R G D G L P K D T R I S D S L A P
12301 atcgggaact ggatcagatc tctggaattg gtccgaaacc aagttcgtct aaatccattc aatgagatct tgttcaatca gctatgtcgt acagtggata

FIGURA 8K

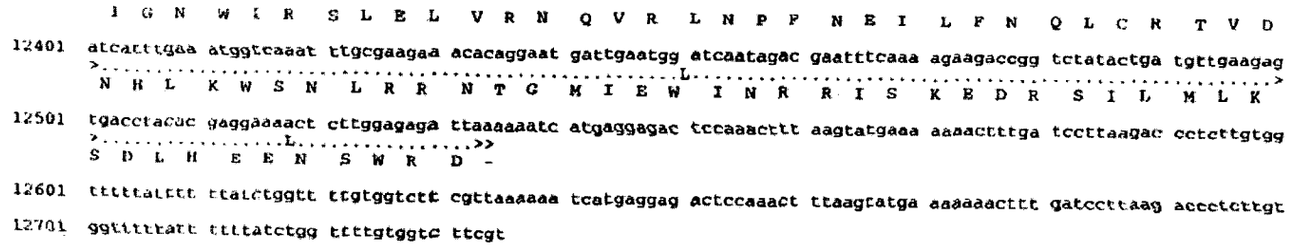

I G N W I R S L E L V R N Q V R L N P F N E I L F N Q L C R T V D
12401 atcatttgaa atggtcaaat ttgcgaagaa acacaggaat gattgaatgg atcaatagac gaatttcaaa agaagaccgg tctatactga tgttgaagag
N H L K W S N L R R N T G M I E W I N R R I S K E D R S I L M L K
12501 tgacctacac gaggaaaact cttggagaga ttaaaaaatc atgaggagac tccaaacttt aagtatgaaa aaaactttga tccttaagac cctcttgtgg
S D L H E E N S W R D -
12601 tttttatttt ttatctggtt ttgtggtctt cgttaaaaaa tcatgaggag actccaaact ttaagtatga aaaaaacttt gatccttaag accctcttgt
12701 ggttttttatt ttttatctgg ttttgtggtc ttcgt

FIGURA 8L

P25-VSV NJ

Comparación de secuecias de amino ácido (AA) y de nucleótido (NT) de virus pasados y originales (P0), Las sustituciones NT y AA en los virus pasados se muestran en negrilla

```
1    acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg
                                                                    >>.........HIV-1 Gag..........>
                                                                      M  G  A   R  A  S   V  L  S

101  gggagaatta gatcgatggg aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg caagcaggga gctagaacga
     >.....................................................HIV-1 Gag.....................................................>
     G  G  E  L   D  R  W   E  K  I   R  L  R  P   G  G  K   K  K  Y   K  L  K  H   I  V  W   A  S  R   E  L  E  R

201  ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat
     >.....................................................HIV-1 Gag.....................................................>
       F  A  V   N  P  G   L  L  E  T   S  E  G   C  R  Q   I  L  G  Q   L  Q  P   S  L  Q   T  G  S  E   E  L  R

301  cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa
     >.....................................................HIV-1 Gag.....................................................>
      S  L  Y   N  T  V  A   T  L  Y   C  V  H   Q  R  I  E   I  K  D   T  K  E   A  L  D  K   I  E  E   E  Q  N

401  aagtaagaaa aaagcacagc aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga acatccaggg gcaaatggta
     >.....................................................HIV-1 Gag.....................................................>
     K  S  K  K   K  A  Q   Q  A  A   A  D  T  G   H  S  N   Q  V  S   Q  N  Y  P   I  V  Q   N  I  Q   G  Q  M  V

                                                                  G
501  catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa aagtagtaga agagaaggct ttcagcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag
     >.....................................................HIV-1 Gag.....................................................>
       H  Q  A   I  S  P   R  T  L  N   A  W  V   K  V  V   E  E  K  A   F  S  P   E  V  I   P  M  F  S   A  L  S
                                                                  G

601  aaggagccac cccacaagat ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc
     >.....................................................HIV-1 Gag.....................................................>
      E  G  A   T  P  Q  D   L  N  T   M  L  N   T  V  G  G   H  Q  A   A  M  Q   M  L  K  E   T  I  N   E  E  A
```

FIGURA 9A

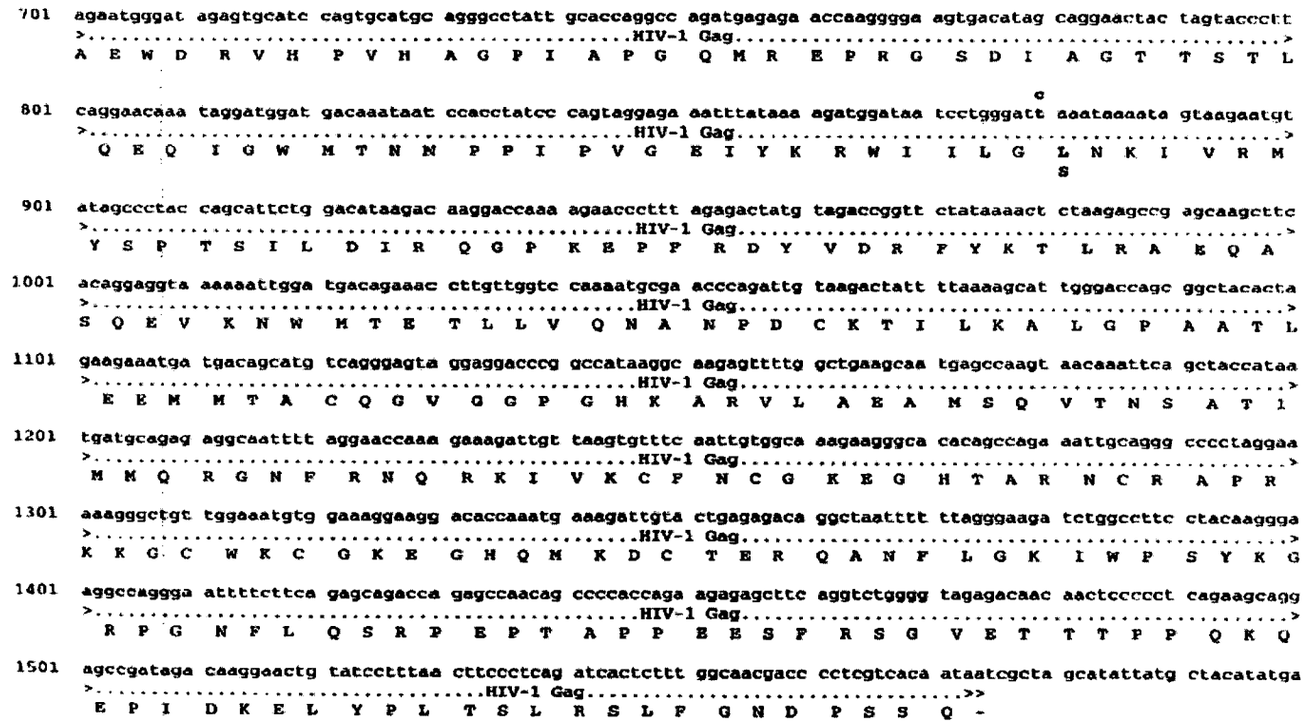

701 agaatgggat agagtgcatc cagtgcatgc agggcctatt gcaccaggcc agatgagaga accaagggga agtgacatag caggaactac tagtacccttt
>.....HIV-1 Gag.....>
A E W D R V H P V H A G P I A P G Q M R E P R G S D I A G T T S T L
801 caggaacaaa taggatggat gacaaataat ccacctatcc cagtaggaga aatttataaa agatggataa tcctgggatt aaataaaata gtaagaatgt
>.....HIV-1 Gag.....>
Q E Q I G W M T N N P P I P V G E I Y K R W I I L G L N K I V R M
S
901 atagccctac cagcattctg gacataagac aaggaccaaa agaacccttt agagactatg tagaccggtt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc
>.....HIV-1 Gag.....>
Y S P T S I L D I R Q G P K E P F R D Y V D R F Y K T L R A E Q A
1001 acaggaggta aaaaattgga tgacagaaac cttgttggtc caaaatgcga acccagattg taagactatt ttaaaagcat tgggaccagc ggctacacta
>.....HIV-1 Gag.....>
S Q E V K N W M T E T L L V Q N A N P D C K T I L K A L G P A A T L
1101 gaagaaatga tgacagcatg tcagggagta ggaggacccg gccataaggc aagagttttg gctgaagcaa tgagccaagt aacaaattca gctaccataa
>.....HIV-1 Gag.....>
E E M M T A C Q G V G G P G H K A R V L A E A M S Q V T N S A T I
1201 tgatgcagag aggcaatttt aggaaccaaa gaaagattgt taagtgtttc aattgtggca aagaagggca cacagccaga aattgcaggg cccctaggaa
>.....HIV-1 Gag.....>
M M Q R G N F R N Q R K I V K C F N C G K E G H T A R N C R A P R
1301 aaagggctgt tggaaatgtg gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga tctggccttc ctacaaggga
>.....HIV-1 Gag.....>
K K G C W K C G K E G H Q M K D C T E R Q A N F L G K I W P S Y K G
1401 aggccaggga attttcttca gagcagacca gagccaacag ccccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactcccccc cagaagcagg
>.....HIV-1 Gag.....>
R P G N F L Q S R P E P T A P P E E S F R S G V E T T T P P Q K Q
1501 agccgataga caaggaactg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcaacgacc cctcgtcaca ataatcgcta gcatattatg ctacatatga
>.....HIV-1 Gag.....>>
E P I D K E L Y P L T S L R S L F G N D P S S Q -

FIGURA 9B

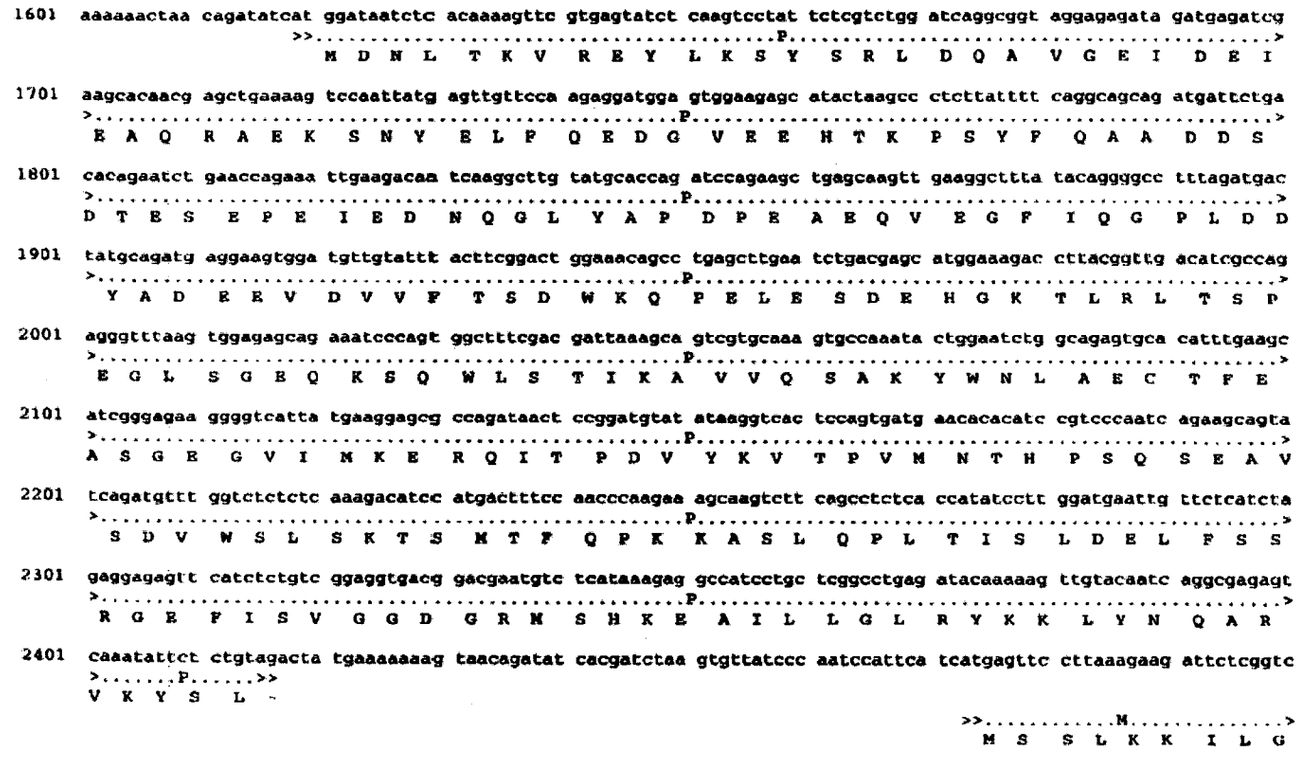

1601 aaaaaactaa cagatatcat ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcggt aggagagata gatgagatcg
M D N L T K V R E Y L K S Y S R L D Q A V G E I D E I
1701 aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga
E A Q R A E K S N Y E L F Q E D G V E E H T K P S Y F Q A A D D S
1801 cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc tgagcaagtt gaaggcttta tacaggggcc tttagatgac
D T E S E P E I E D N Q G L Y A P D P E A E Q V E G F I Q G P L D D
1901 tatgcagatg aggaagtgga tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac cttacggttg acatcgccag
Y A D E E V D V V F T S D W K Q P E L E S D E H G K T L R L T S P
2001 agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc
E G L S G E Q K S Q W L S T I K A V V Q S A K Y W N L A E C T F E
2101 atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta
A S G E G V I M K E R Q I T P D V Y K V T P V M N T H P S Q S E A V
2201 tcagatgttt ggtctctctc aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt ggatgaattg ttctcatcta
S D V W S L S K T S M T F Q P K K A S L Q P L T I S L D E L F S S
2301 gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt
R G E F I S V G G D G R M S H K E A I L L G L R Y K K L Y N Q A R
2401 caaatattct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc aatccattca tcatgagttc cttaaagaag attctcggtc
V K Y S L
M S S L K K I L G

FIGURA 9C

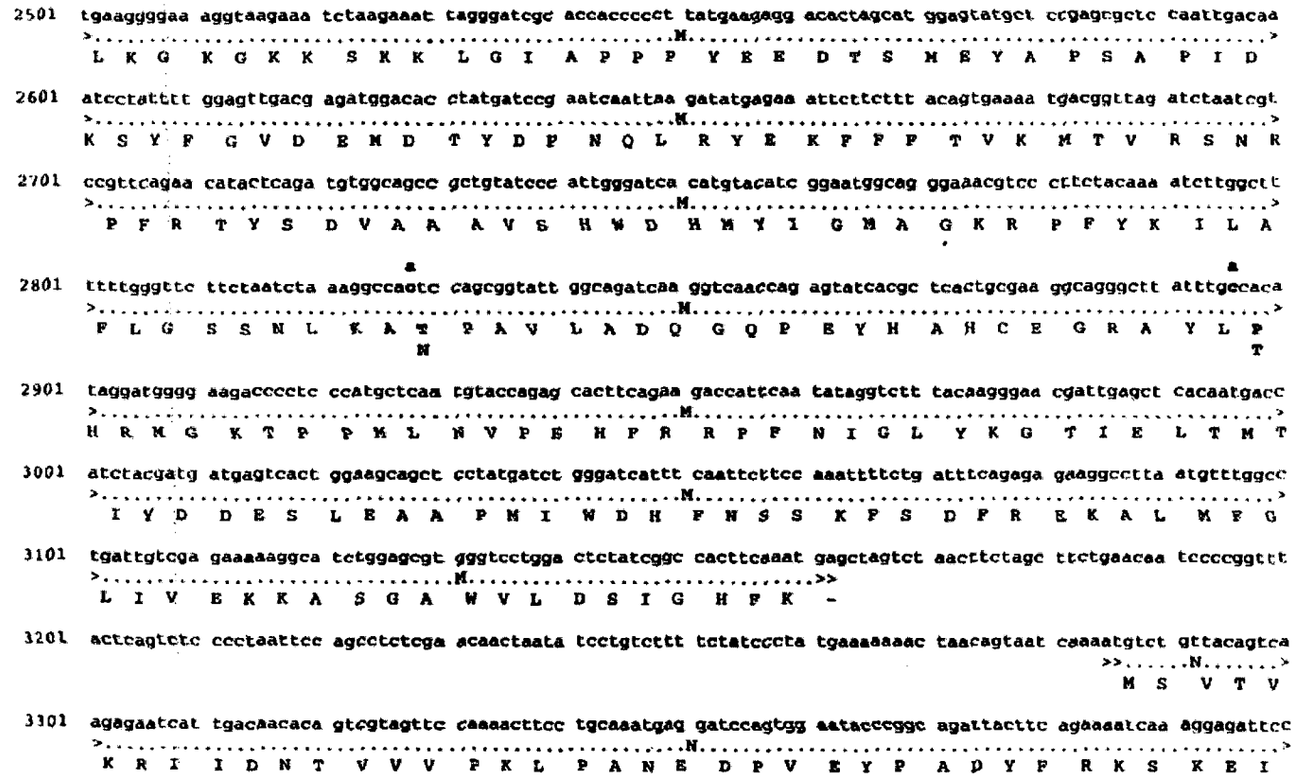

2501 tgaaggggaa aggtaagaaa tctaagaaat tagggatcgc accacccccc tatgaagagg acactagcat ggagtatgct ccgagcgctc caattgacaa
L K G K G K K S K K L G I A P P P Y E E D T S M E Y A P S A P I D
2601 atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt
K S Y F G V D E M D T Y D P N Q L R Y E K F F P T V K M T V R S N R
2701 ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt
P F R T Y S D V A A A V S H W D H M Y I G M A G K R P F Y K I L A
2801 ttttgggttc ttctaatcta aaggccaatc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa ggcagggctt atttgcacca
F L G S S N L K A T P A V L A D Q G Q P E Y H A H C E G R A Y L P
2901 taggatgggg aagaccccta ccatgctcaa tgtaccagag cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc
H R M G K T P P M L N V P E H P R R P F N I G L Y K G T I E L T M T
3001 atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc aaatttttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc
I Y D D E S L E A A P M I W D H F N S S K P S D P R E K A L M F G
3101 tgattgtcga gaaaaaggca tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc ttctgaacaa tccccggttt
L I V E K K A S G A W V L D S I G H F K -
3201 actcagtctc cctaattcc agcctctcga acaactaata tcctgtcttt tctatccctа tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca
M S V T V
3301 agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc
K R I I D N T V V V P K L P A N E D P V E Y P A D Y F R K S K E I

FIGURA 9D

```
3401  tctttacatc aatactacaa aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa tcatacatgt caacagctac
      >.....................................................N.....................................................>
      P  L  Y  I  N  T  T  K  S  L  S  D  L  R  G  Y  V  Y  Q  G  L  K  S  G  N  V  S  I  I  H  V  N  S  Y

3501  ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg
      >.....................................................N.....................................................>
        L  Y  G  A  L  K  D  I  R  G  K  L  D  K  D  W  S  S  F  G  I  N  I  G  K  A  G  D  T  I  G  I  F

3601  accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact
      >.....................................................N.....................................................>
       D  L  V  S  L  K  A  L  D  G  V  L  P  D  G  V  S  D  A  S  R  T  S  A  D  D  K  W  L  P  L  Y  L

3701  tggcttatac agagtgggca gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa tgatcaatga acagtttgaa
      >.....................................................N.....................................................>
      L  G  L  Y  R  V  G  R  T  Q  M  P  E  Y  R  K  K  L  M  D  G  L  T  N  Q  C  K  M  I  N  E  Q  F  E

3801  cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca
      >.....................................................N.....................................................>
        P  L  V  P  E  G  R  D  I  F  D  V  W  G  N  D  S  N  Y  T  K  I  V  A  A  V  D  M  F  F  H  M  F

3901  aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg
      >.....................................................N.....................................................>
       K  K  H  E  C  A  S  F  R  Y  G  T  I  V  S  R  F  K  D  C  A  A  L  A  T  F  G  H  L  C  K  I  T

4001  aatgtctaca gaagatgtaa cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc aagaaattga caaggccgat
      >.....................................................N.....................................................>
      G  M  S  T  E  D  V  T  T  W  I  L  N  R  E  V  A  D  E  M  V  Q  M  N  L  P  G  Q  E  I  D  K  A  D

4101  tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc
      >.....................................................N.....................................................>
        S  Y  M  P  Y  L  I  D  F  G  L  S  S  K  S  P  Y  S  S  V  K  N  P  A  F  H  F  W  G  Q  L  T  A

4201  ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg
      >.....................................................N.....................................................>
       L  L  L  R  S  T  R  A  R  N  A  R  Q  P  D  D  I  E  Y  T  S  L  T  T  A  G  L  L  Y  A  Y  A  V

4301  atcctctgcc gacttggcac aacagttttg tgttggagat aacaaatacа ctccagatga tagtaccgga ggattgacga ctaatgcacc gccacaaggc
      >.....................................................N.....................................................>
      G  S  S  A  D  L  A  Q  Q  F  C  V  G  D  N  K  Y  T  P  D  D  S  T  G  G  L  T  T  N  A  P  P  Q  G

4401  agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag
```

FIGURA 9E

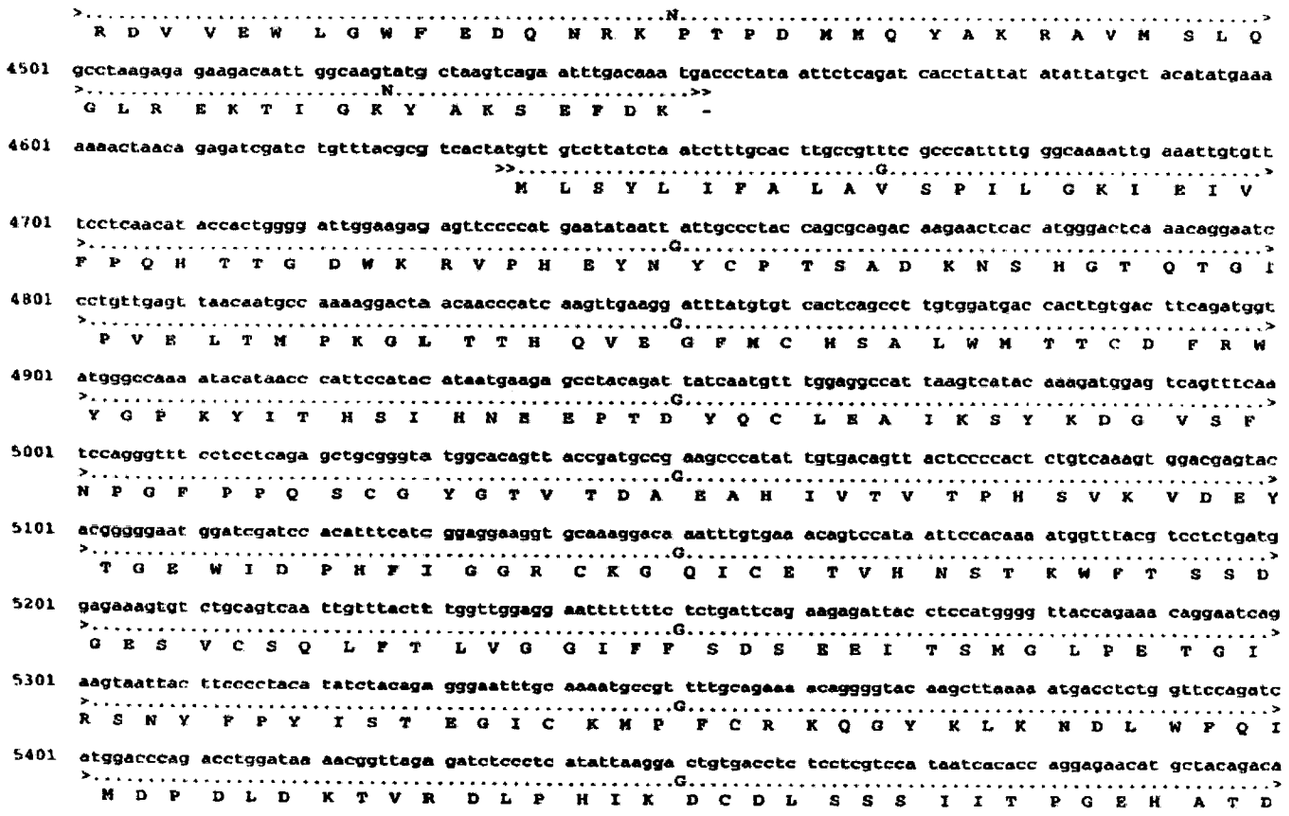


FIGURA 9F

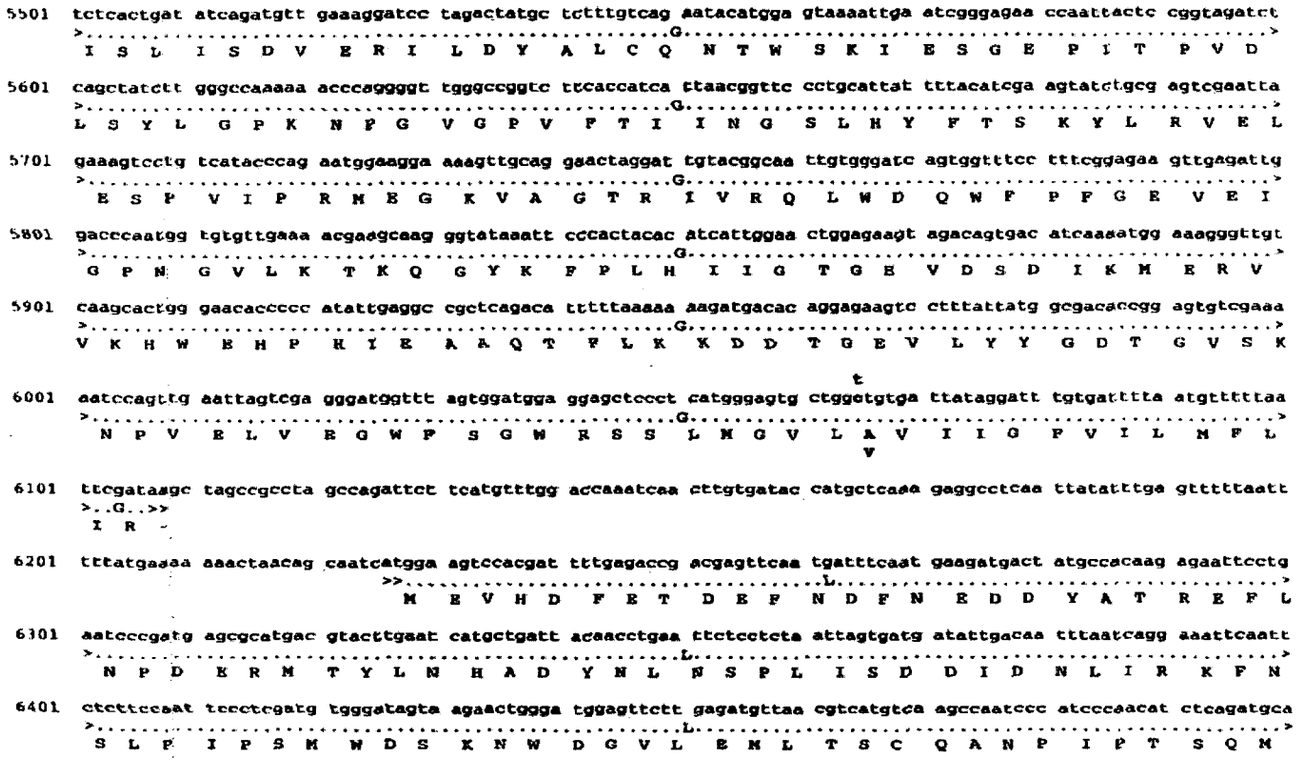

5501 tctcactgat atcagatgtt gaaaggatcc tagactatgc tctttgtcag aatacatgga gtaaaattga atcgggagaa ccaattactc cggtagatct
I S L I S D V E R I L D Y A L C Q N T W S K I E S G E P I T P V D
5601 cagctatctt gggccaaaaa acccaggggt tgggccggtc ttcaccatca ttaacggttc cctgcattat tttacatcga agtatctgcg agtcgaatta
L S Y L G P K N P G V G P V F T I I N G S L H Y F T S K Y L R V E L
5701 gaaagtcctg tcatacccag aatggaagga aaagttgcag gaactaggat tgtacggcaa ttgtgggatc agtggtttcc tttcggagaa gttgagattg
E S P V I P R M E G K V A G T R I V R Q L W D Q W F P F G E V E I
5801 gaccccaatgg tgtgttgaaa acgaagcaag ggtataaatt cccactacac atcattggaa ctggagaagt agacagtgac atcaaaatgg aaagggttgt
G P N G V L K T K Q G Y K F P L H I I G T G E V D S D I K M E R V
5901 caagcactgg gaacaccccc atattgaggc cgctcagaca tttttaaaaa aagatgacac aggagaagtc ctttattatg gcgacaccgg agtgtcgaaa
V K H W E H P H I E A A Q T F L K K D D T G E V L Y Y G D T G V S K
t
6001 aatccagttg aattagtcga gggatggttt agtggatgga ggagctccct catgggagtg ctggctgtga ttataggatt tgtgatttta atgtttttaa
N P V E L V R G W F S G W R S S L M G V L A V I I G F V I L M F L
v
6101 ttcgataagc tagccgccta gccagattct tcatgtttgg accaaatcaa cttgtgatac catgctcaaa gaggcctcaa ttatatttga gtttttaatt
I R -
6201 tttatgaaaa aaactaacag caatcatgga agtccacgat tttgagaccg acgagttcaa tgatttcaat gaagatgact atgccacaag agaattcctg
M E V H D F E T D E F N D F N E D D Y A T R E F L
6301 aatcccgatg agcgcatgac gtacttgaat catgctgatt acaacctgaa ttctcctcta attagtgatg atattgacaa tttaatcagg aaattcaatt
N P D E R M T Y L N H A D Y N L N S P L I S D D I D N L I R K F N
6401 ctcttccaat tcctcgatg tgggatagta agaactggga tggagttctt gagatgttaa cgtcatgtca agccaatccc atcccaacat ctcagatgca
S L F I P S M W D S K N W D G V L E M L T S C Q A N P I P T S Q M

FIGURA 9G

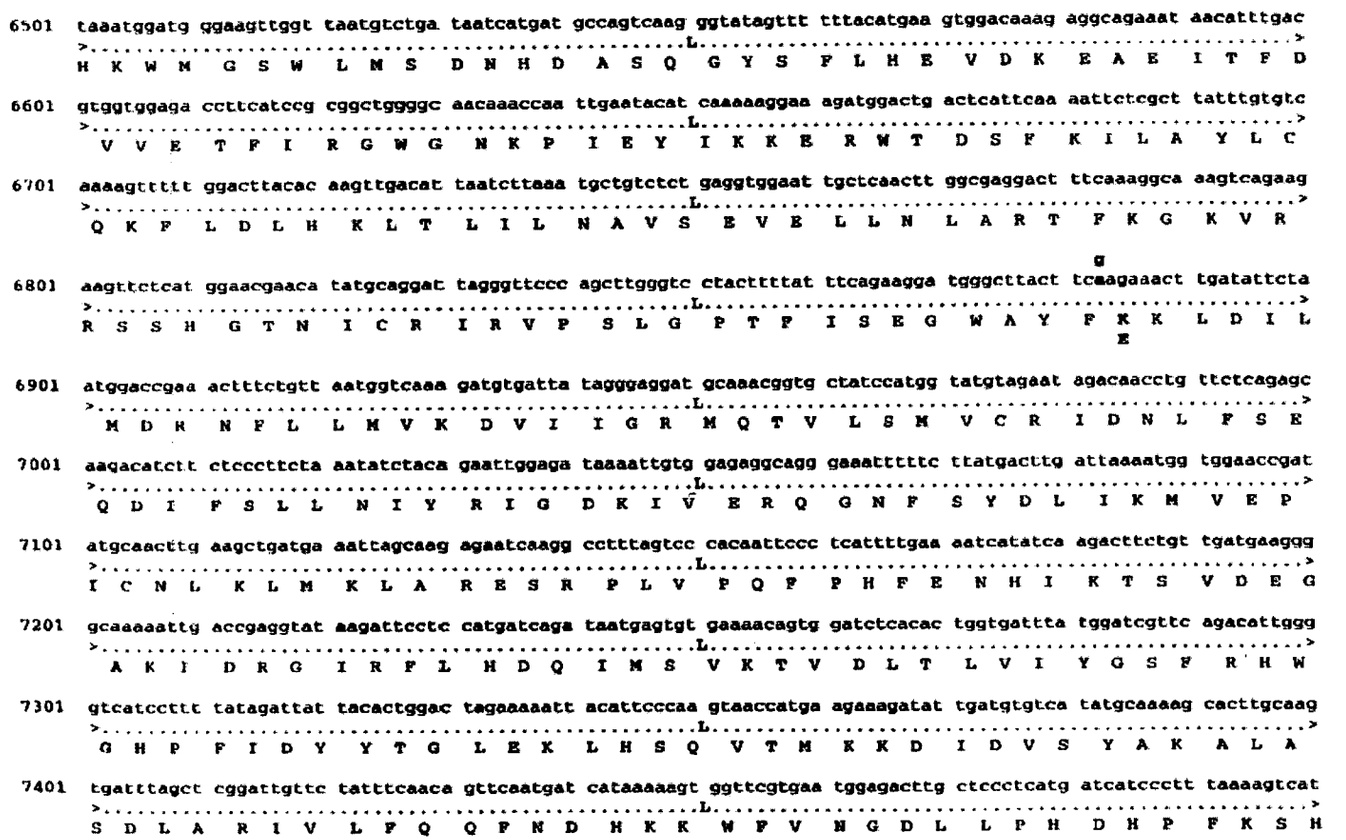

6501 taaatggatg ggaagttggt taatgtctga taatcatgat gccagtcaag ggtatagttt tttacatgaa gtggacaaag aggcagaaat aacatttgac
H K W M G S W L M S D N H D A S Q G Y S F L H E V D K E A E I T F D
6601 gtggtggaga ccttcatccg cggctggggc aacaaaccaa ttgaatacat caaaaaggaa agatggactg actcattcaa aattctcgct tatttgtgtc
V V E T F I R G W G N K P I E Y I K K E R W T D S F K I L A Y L C
6701 aaaagttttt ggacttacac aagttgacat taatcttaaa tgctgtctct gaggtggaat tgctcaactt ggcgaggact ttcaaaggca aagtcagaag
Q K F L D L H K L T L I L N A V S E V E L L N L A R T F K G K V R
6801 aagttctcat ggaacgaaca tatgcaggat tagggttccc agcttgggtc ctacttttat ttcagaagga tgggcttact tcaagaaact tgatattcta
R S S H G T N I C R I R V P S L G P T F I S E G W A Y F K K L D I L
6901 atggaccgaa actttctgtt aatggtcaaa gatgtgatta tagggaggat gcaaacggtg ctatccatgg tatgtagaat agacaacctg ttctcagagc
M D R N F L L M V K D V I I G R M Q T V L S M V C R I D N L F S E
7001 aagacatctt ctcccttcta aatatctaca gaattggaga taaaattgtg gagaggcagg gaaatttttc ttatgacttg attaaaatgg tggaaccgat
Q D I F S L L N I Y R I G D K I V E R Q G N F S Y D L I K M V E P
7101 atgcaacttg aagctgatga aattagcaag agaatcaagg cctttagtcc cacaattccc tcattttgaa aatcatatca agacttctgt tgatgaaggg
I C N L K L M K L A R E S R P L V P Q F P H F E N H I K T S V D E G
7201 gcaaaaattg accgaggtat aagattcctc catgatcaga taatgagtgt gaaaacagtg gatctcacac tggtgattta tggatcgttc agacattggg
A K I D R G I R F L H D Q I M S V K T V D L T L V I Y G S F R H W
7301 gtcatccttt tatagattat tacactggac tagaaaaatt acattcccaa gtaaccatga agaaagatat tgatgtgtca tatgcaaaag cacttgcaag
G H P F I D Y Y T G L E K L H S Q V T M K K D I D V S Y A K A L A
7401 tgatttagct cggattgttc tatttcaaca gttcaatgat ataaaaagt ggttcgtgaa tggagacttg ctccctcatg atcatccctt taaaagtcat
S D L A R I V L F Q Q F N D H K K W F V N G D L L P H D H P F K S H

FIGURA 9H

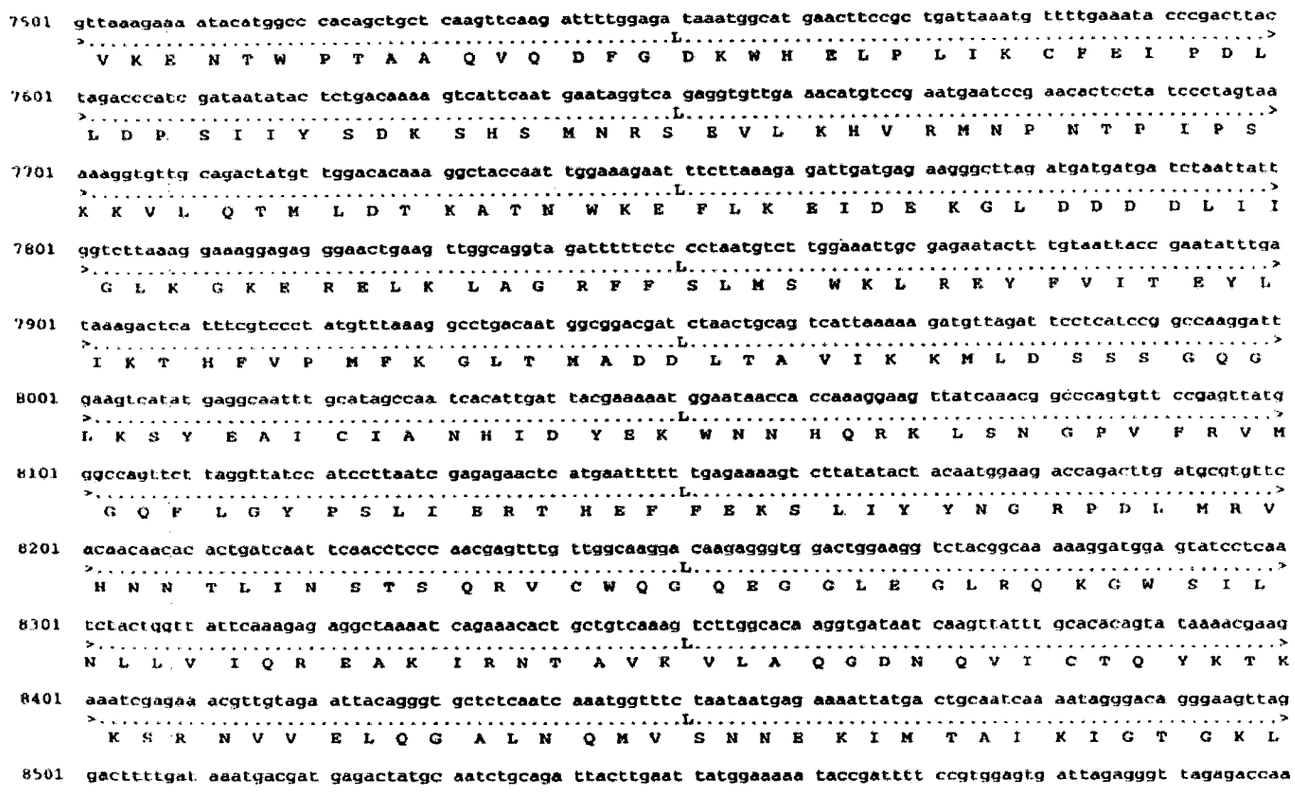

7501 gttaaagaaa atacatggcc cacagctgct caagttcaag attttggaga taaatggcat gaacttccgc tgattaaatg ttttgaaata cccgacttac
V K E N T W P T A A Q V Q D F G D K W H E L P L I K C F E I P D L
7601 tagacccatc gataatatac tctgacaaaa gtcattcaat gaataggtca gaggtgttga aacatgtccg aatgaatccg aacactccta tccctagtaa
L D P S I I Y S D K S H S M N R S E V L K H V R M N P N T P I P S
7701 aaaggtgttg cagactatgt tggacacaaa ggctaccaat tggaaagaat ttcttaaaga gattgatgag aagggcttag atgatgatga tctaatttatt
K K V L Q T M L D T K A T N W K E F L K E I D E K G L D D D D L I I
7801 ggtcttaaag gaaaggagag ggaactgaag ttggcaggta gatttttctc cctaatgtct tggaaattgc gagaatactt tgtaattacc gaatatttga
G L K G K E R E L K L A G R F F S L M S W K L R E Y F V I T E Y L
7901 taaagactca tttcgtccct atgtttaaag gcctgacaat ggcggacgat ctaactgcag tcattaaaaa gatgttagat tcctcatccg gccaaggatt
I K T H F V P M F K G L T M A D D L T A V I K K M L D S S S G Q G
8001 gaagtcatat gaggcaattt gcatagccaa tcacattgat tacgaaaaat ggaataacca ccaaaggaag ttatcaaacg gcccagtgtt ccgagttatg
L K S Y E A I C I A N H I D Y E K W N N H Q R K L S N G P V F R V M
8101 ggccagttct taggttatcc atccttaatc gagagaactc atgaattttt tgagaaaagt cttatatact acaatggaag accagacttg atgcgtgttc
G Q F L G Y P S L I E R T H E F F E K S L I Y Y N G R P D L M R V
8201 acaacaacac actgatcaat tcaacctccc aacgagtttg ttggcaagga caagagggtg gactggaagg tctacggcaa aaaggatgga gtatcctcaa
H N N T L I N S T S Q R V C W Q G Q E G G L E G L R Q K G W S I L
8301 tctactggtt attcaaagag aggctaaaat cagaaacact gctgtcaaag tcttggcaca aggtgataat caagttattt gcacacagta taaaacgaag
N L L V I Q R E A K I R N T A V R V L A Q G D N Q V I C T Q Y K T K
8401 aaatcgagaa acgttgtaga attacagggt gctctcaatc aaatggtttc taataatgag aaaattatga ctgcaatcaa aatagggaca gggaagttag
K S R N V V E L Q G A L N Q M V S N N E K I M T A I K I G T G K L
8501 gacttttgat aaatgacgat gagactatgc aatctgcaga ttacttgaat tatggaaaaa taccgatttt ccgtggagtg attagagggt tagagaccaa

FIGURA 9I

```
      >.....L.....>
       G L L I N D D E T M Q S A D Y L N Y G K I P I F R G V I R G L E T

8601  gagatggtca cgagtgactt gtgtcaccaa tgaccaaata cccacttgtg ctaatataat gagctcagtt tccacaaatg ctctcaccgt agctcatttt
      >.....L.....>
      K R W S R V T C V T N D Q I P T C A N I M S S V S T N A L T V A H F

8701  gctgagaacc caatcaatgc catgatacag tacaattatt ttgggacatt tgctagactc ttgttgatga tgcatgatcc tgctcttcgt caatcattgt
      >.....L.....>
        A E N P I N A M I Q Y N Y F G T F A R L L L M M H D P A L R Q S L

8801  atgaagttca agataagata ccgggcttgc acagttctac tttcaaatac gccatgttgt atttggaccc ttccattgga ggagtgtcgg gcatgtcttt
      >.....L.....>
       Y E V Q D K I P G L H S S T F K Y A M L Y L D P S I G G V S G M S

8901  gtccaggttt ttgattagag ccttcccaga tcccgtaaca gaaagtctct cattctggag attcatccat gtacatgctc gaagtgagca tctgaaggag
      >.....L.....>
      L S R F L I R A F P D P V T E S L S F W R F I H V H A R S E H L K E

9001  atgagtgcag tatttggaaa ccccgagata gccaagtttc gaataactca catagacaag ctagtagaag atccaacctc tctgaacatc gctatgggaa
      >.....L.....>
        M S A V F G N P E I A K F R I T H I D K L V E D P T S L N I A M G

9101  tgagtccagc gaacttgtta aagactgagg ttaaaaaatg cttaatcgaa tcaagacaaa ccatcaggaa ccaggtgatt aaggatgcaa ccatatattt
      >.....L.....>
       M S P A N L L K T E V K K C L I E S R Q T I R N Q V I K D A T I Y

9201  gtatcatgaa gaggatcggc tcagaagttt cttatggtca ataaatcctc tgttccctag atttttaagt gaattcaaat caggcacttt tttgggagtc
      >.....L.....>
      L Y H E E D R L R S F L W S I N P L P P R F L S E P K S G T F L G V

9301  gcagacgggc tcatcagtct atttcaaaat tctcgtacta ttcggaactc ctttaagaaa aagtatcata gggaattgga tgatttgatt gtgaggagtg
      >.....L.....>
        A D G L I S L F Q N S R T I R N S F K X K Y H R E L D D L I V R S

9401  aggtatcctc tttgacacat ttagggaaac ttcatttgag aaggggatca tgtaaaatgt ggacatgttc agctactcat gctgacacat taagatacaa
      >.....L.....>
       E V S S L T H L G K L H L R R G S C K M W T C S A T H A D T L R Y

9501  atcctggggc cgtacagtta ttgggacaac tgtaccccat ccattagaaa tgttgggtcc acaacatcga aaagagactc cttgtgcacc atgtaacaca
      >.....L.....>
      K S W G R T V I G T T V P H P L E M L G P Q H R K E T P C A P C N T
```

FIGURA 9J

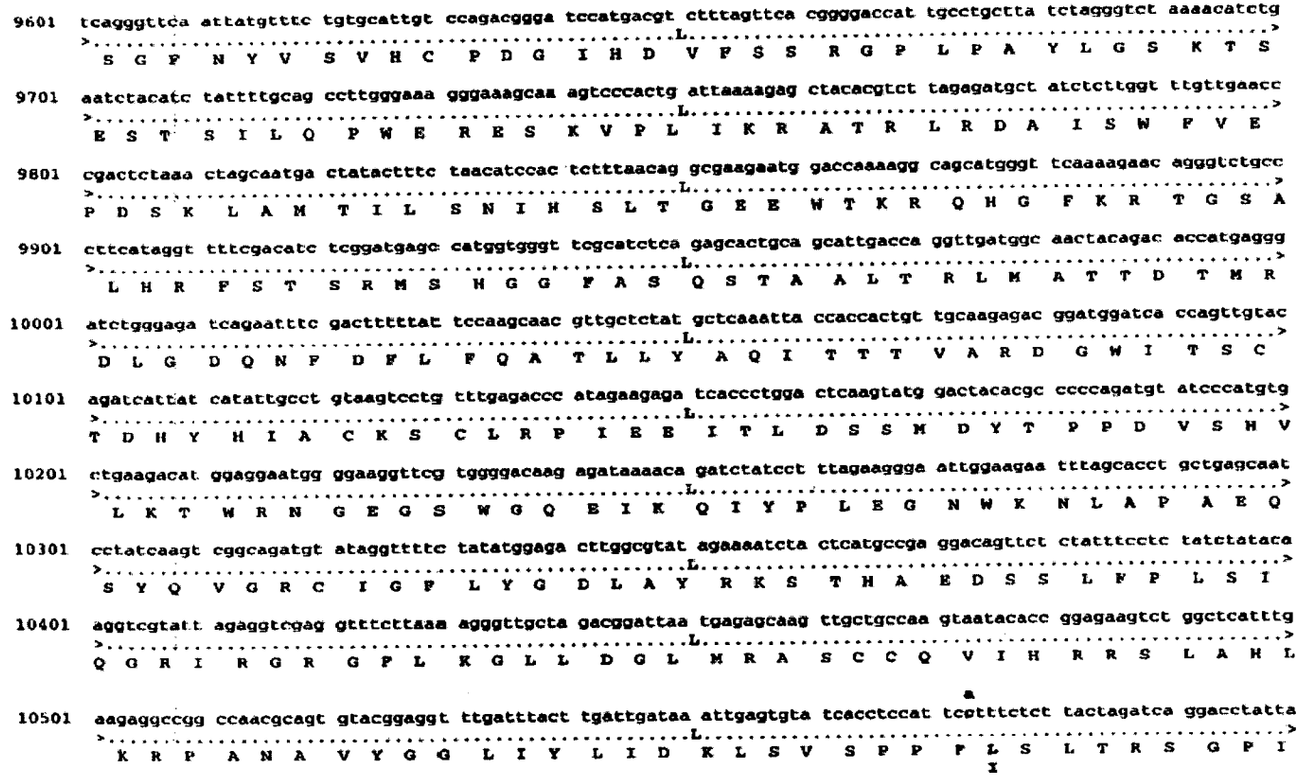

9601 tcagggttca attatgtttc tgtgcattgt ccagacggga tccatgacgt ctttagttca cggggaccat tgcctgctta tctagggtct aaaacatctg
S G F N Y V S V H C P D G I H D V F S S R G P L P A Y L G S K T S
9701 aatctacatc tattttgcag ccttgggaaa gggaaagcaa agtcccactg attaaaagag ctacacgtct tagagatgct atctcttggt ttgttgaacc
E S T S I L Q P W E R E S K V P L I K R A T R L R D A I S W F V E
9801 cgactctaaa ctagcaatga ctatactttc taacatccac tctttaacag gcgaagaatg gaccaaaagg cagcatgggt tcaaaagaac agggtctgcc
P D S K L A M T I L S N I H S L T G E E W T K R Q H G F K R T G S A
9901 cttcataggt tttcgacatc tcggatgagc catggtgggt tcgcatctca gagcactgca gcattgacca ggttgatggc aactacagac accatgaggg
L H R F S T S R M S H G G F A S Q S T A A L T R L M A T T D T M R
10001 atctgggaga tcagaatttc gacttttTat tccaagcaac gttgctctat gctcaaatta ccaccactgt tgcaagagac ggatggatca ccagttgtac
D L G D Q N F D F L F Q A T L L Y A Q I T T T V A R D G W I T S C
10101 agatcattat catattgcct gtaagtcctg tttgagaccc atagaagaga tcaccctgga ctcaagtatg gactacacgc ccccagatgt atcccatgtg
T D H Y H I A C K S C L R P I E E I T L D S S M D Y T P P D V S H V
10201 ctgaagacat ggaggaatgg ggaaggttcg tggggacaag agataaaaca gatctatcct ttagaaggga attggaagaa tttagcacct gctgagcaat
L K T W R N G E G S W G Q E I K Q I Y P L E G N W K N L A P A E Q
10301 cctatcaagt cggcagatgt ataggtttTc tatatggaga cttggcgtat agaaaatcta ctcatgccga ggacagttct ctatttcctc tatctataca
S Y Q V G R C I G F L Y G D L A Y R K S T H A E D S S L F P L S I
10401 aggtcgtatt agaggtcgag gtttcttaaa agggttgcta gacggattaa tgagagcaag ttgctgccaa gtaatacacc ggagaagtct ggctcatttg
Q G R I R G R G F L K G L L D G L M R A S C C Q V I H R R S L A H L
a
10501 aagaggccgg ccaacgcagt gtacggaggt ttgatttact tgattgataa attgagtgta tcacctccat tcgtttctct tactagatca ggacctatta
K R P A N A V Y G G L I Y L I D K L S V S P P F L S L T R S G P I
I

FIGURA 9K

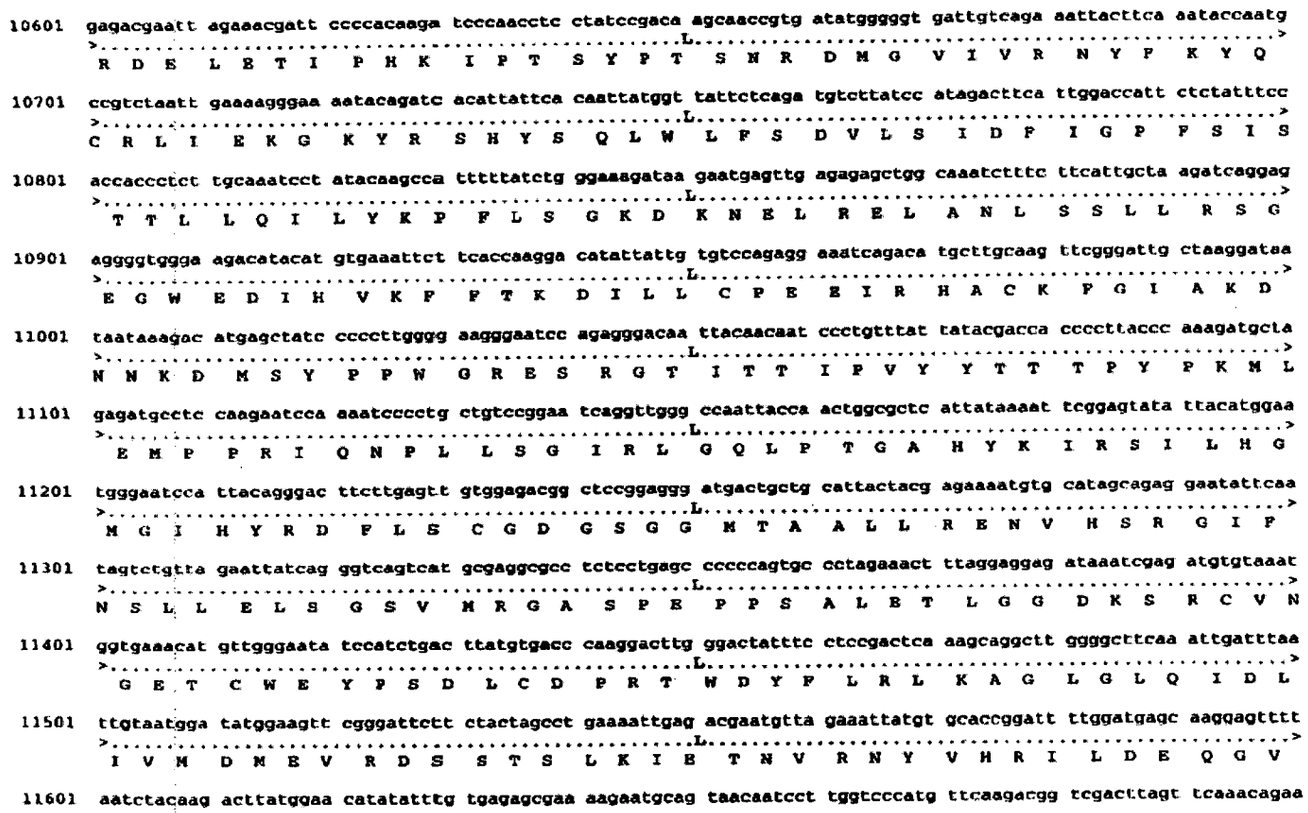

10601 gagacgaatt agaaacgatt ccccacaaga tcccaacctc ctatccgaca agcaaccgtg atatgggggt gattgtcaga aattacttca aataccaatg
R D E L E T I P H K I P T S Y P T S N R D M G V I V R N Y P K Y Q
10701 ccgtctaatt gaaaagggaa aatacagatc acattattca caattatggt tattctcaga tgtcttatcc atagacttca ttggaccatt ctctatttcc
C R L I E K G K Y R S H Y S Q L W L F S D V L S I D P I G P F S I S
10801 accacccttct tgcaaatcct atacaagcca tttttatctg ggaaagataa gaatgagttg agagagctgg caaatctttc ttcattgcta agatcaggag
T T L L Q I L Y K P F L S G K D K N E L R E L A N L S S L L R S G
10901 aggggtggga agacatacat gtgaaattct tcaccaagga catattattg tgtccagagg aaatcagaca tgcttgcaag ttcgggattg ctaaggataa
E G W E D I H V K F F T K D I L L C P E E I R H A C K F G I A K D
11001 taataaagac atgagctatc ccccttgggg aagggaatcc agagggacaa ttacaacaat ccctgtttat tatacgacca ccccttaccc aaagatgcta
N N K D M S Y P P W G R E S R G T I T T I P V Y Y T T T P Y P K M L
11101 gagatgcctc caagaatcca aaatcccctg ctgtccggaa tcaggttggg ccaattacca actggcgctc attataaaat tcggagtata ttacatggaa
E M P P R I Q N P L L S G I R L G Q L P T G A H Y K I R S I L H G
11201 tgggaatcca ttacagggac ttcttgagtt gtggagacgg ctccggaggg atgactgctg cattactacg agaaaatgtg catagcagag gaatattcaa
M G I H Y R D F L S C G D G S G G M T A A L L R E N V H S R G I P
11301 tagtctgtta gaattatcag ggtcagtcat gcgaggcgcc tctcctgagc cccccagtgc cctagaaact ttaggaggag ataaatcgag atgtgtaaat
N S L L E L S G S V M R G A S P E P P S A L E T L G G D K S R C V N
11401 ggtgaaacat gttgggaata tccatctgac ttatgtgacc caaggacttg ggactatttc ctccgactca aagcaggctt ggggcttcaa attgatttaa
G E T C W E Y P S D L C D P R T W D Y F L R L K A G L G L Q I D L
11501 ttgtaatgga tatggaagtt cgggattctt ctactagcct gaaaattgag acgaatgtta gaaattatgt gcaccggatt ttggatgagc aaggagtttt
I V M D M E V R D S S T S L K I E T N V R N Y V H R I L D E Q G V
11601 aatctacaag acttatggaa catatatttg tgagagcgaa aagaatgcag taacaatcct tggtcccatg ttcaagacgg tcgacttagt tcaaacagaa

FIGURA 9L

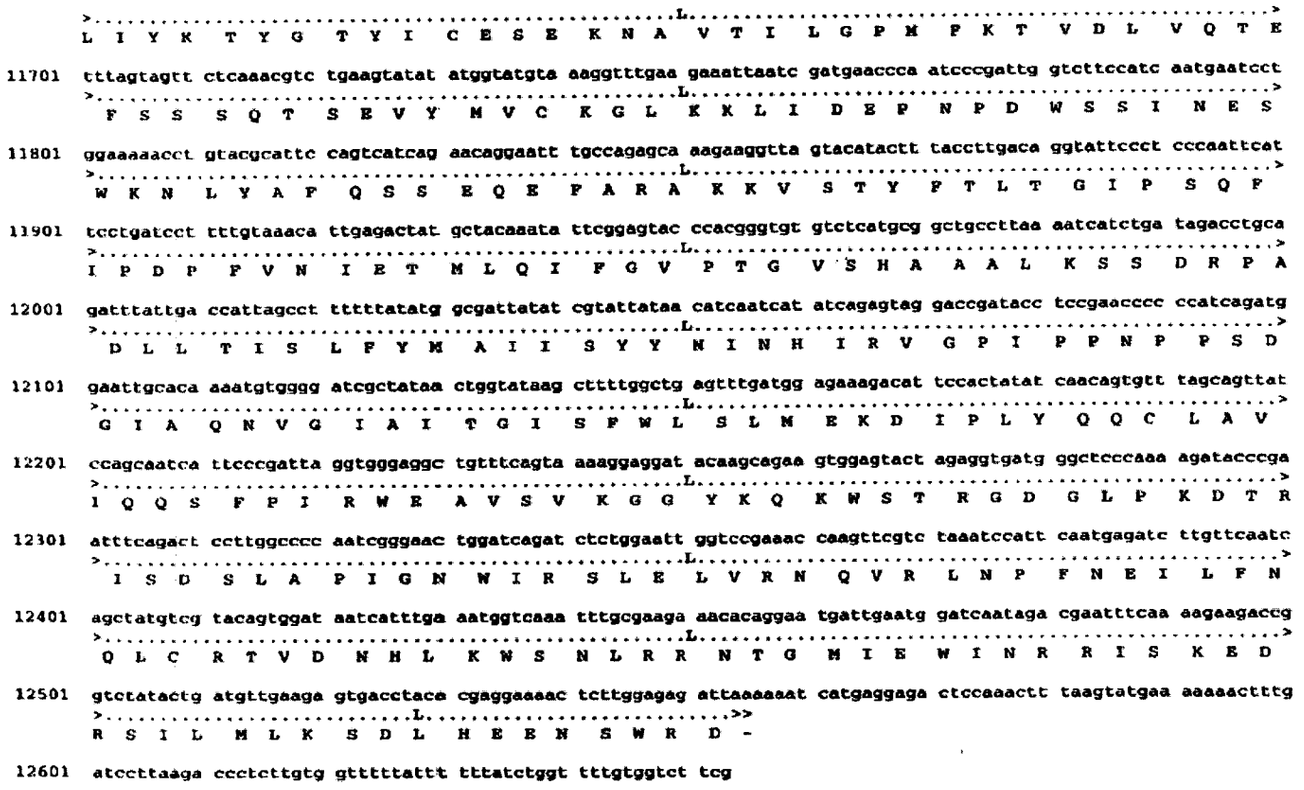

L I Y K T Y G T Y I C E S E K N A V T I L G P M F K T V D L V Q T E
11701 tttagtagtt ctcaaacgtc tgaagtatat atggtatgta aaggtttgaa gaaattaatc gatgaaccca atcccgattg gtcttccatc aatgaatcct
F S S S Q T S E V Y M V C K G L K K L I D E P N P D W S S I N E S
11801 ggaaaaacct gtacgcattc cagtcatcag aacaggaatt tgccagagca aagaaggtta gtacatactt taccttgaca ggtattccct cccaattcat
W K N L Y A F Q S S E Q E F A R A K K V S T Y F T L T G I P S Q F
11901 tcctgatcct tttgtaaaca ttgagactat gctacaaata ttcggagtac ccacgggtgt gtctcatgcg gctgccttaa aatcatctga tagacctgca
I P D P F V N I E T M L Q I F G V P T G V S H A A A L K S S D R P A
12001 gatttattga ccattagcct tttttatatg gcgattatat cgtattataa catcaatcat atcagagtag gaccgatacc tccgaacccc ccatcagatg
D L L T I S L F Y M A I I S Y Y N I N H I R V G P I P P N P P S D
12101 gaattgcaca aaatgtgggg atcgctataa ctggtataag cttttggctg agtttgatgg agaaagacat tccactatat caacagtgtt tagcagttat
G I A Q N V G I A I T G I S F W L S L M E K D I P L Y Q Q C L A V
12201 ccagcaatca ttcccgatta ggtgggaggc tgtttcagta aaaggaggat acaagcagaa gtggagtact agaggtgatg ggctcccaaa agataccega
I Q Q S F P I R W E A V S V K G G Y K Q K W S T R G D G L P K D T R
12301 atttcagact ccttggcccc aatcgggaac tggatcagat ctctggaatt ggtccgaaac caagttcgtc taaatccatt caatgagatc ttgttcaatc
I S D S L A P I G N W I R S L E L V R N Q V R L N P F N E I L F N
12401 agctatgtcg tacagtggat aatcatttga aatggtcaaa tttgcgaaga aacacaggaa tgattgaatg gatcaataga cgaatttcaa aagaagaccg
Q L C R T V D N H L K W S N L R R N T G M I E W I N R R I S K E D
12501 gtctatactg atgttgaaga gtgacctaca cgaggaaaac tcttggagag attaaaaaat catgaggaga ctccaaactt taagtatgaa aaaaactttg
R S I L M L K S D L H E E N S W R D -
12601 atccttaaga ccctcttgtg gtttttattt tttatctggt tttgtggtct tcg

FIGURA 9M

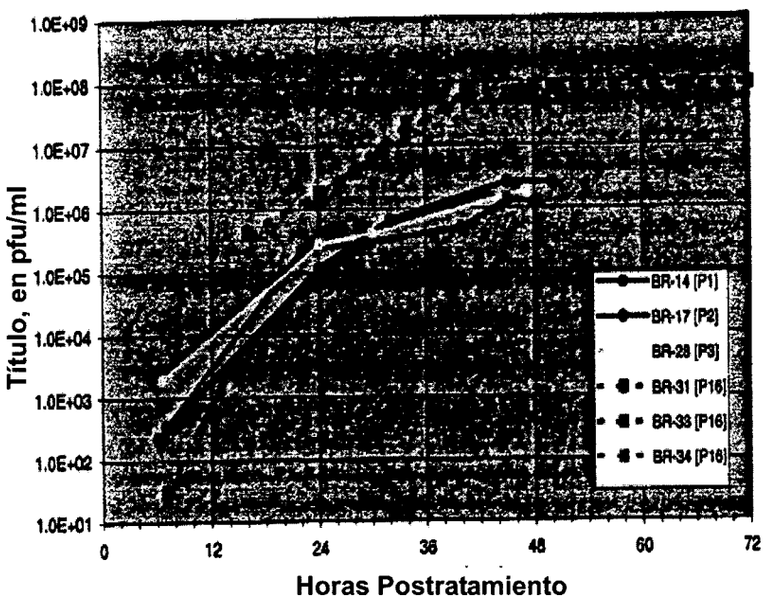

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
Título, en pfu/ml
0
12
24
36
48
60
72
Horas Postratamiento
BR-14 [P1]
BR-17 [P2]
BR-28 [P3]
BR-31 [P16]
BR-33 [P16]
BR-34 [P16]

FIGURA 10

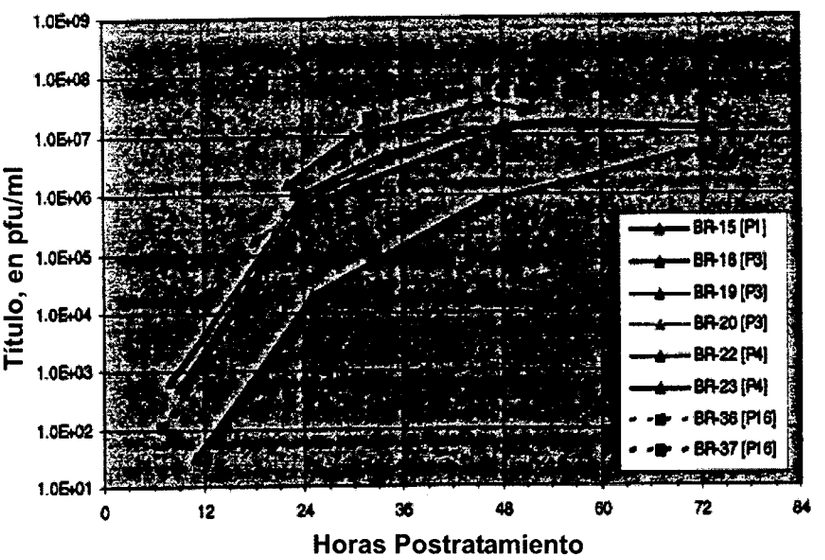

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
Título, en pfu/ml
0
12
24
36
48
60
72
84
Horas Postratamiento
BR-15 [P1]
BR-18 [P3]
BR-19 [P3]
BR-20 [P3]
BR-22 [P4]
BR-23 [P4]
BR-36 [P16]
BR-37 [P16]

FIGURA 11

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MALLON, Veronica
Wyeth LLC
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
04 February 2010 (04.02.2010)

Applicant's or agent's file reference
AM102885

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/087375

International filing date *(day/month/year)*
18 December 2008 (18.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
WYETH
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
WYETH LLC
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The above change is to be recorded also in respect of the agent, as indicated in the addressee box at the top of this form.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Blanc Veronique
e-mail PT08.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 08

Sequence Listing

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> Genetically Modified Attenuated Vesicular Stomatitis Virus, Compositions and Methods of Use Thereof

<130> AM102885

<150> 61/015,868
<151> 2007-12-21

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 15732
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 1

acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc 60

aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgatggg 120

aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg 180

caagcaggga gctagaacga ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct 240

gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat 300

cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca 360

ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa aagtaagaaa aaagcacagc 420

aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga 480

acatccaggg gcaaatggta catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa 540

aagtagtaga agagaaggct ttcagcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag 600

aaggagccac cccacaagat ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag 660

ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc agaatgggat agagtgcatc 720

cagtgcatgc agggcctatt gcaccaggcc agatgagaga accaagggga agtgacatag 780

caggaactac tagtaccctt caggaacaaa taggatggat gacaaataat ccacctatcc 840

cagtaggaga aatttataaa agatggataa tcctgggatt aaataaaata gtaagaatgt 900

atagccctac cagcattctg gacataagac aaggaccaaa agaacccttt agagactatg 960

tagaccggtt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc acaggaggta aaaaattgga 1020

tgacagaaac cttgttggtc caaaatgcga acccaaattg taagactatt ttaaaagcat 1080

tgggaccagc ggctacacta gaagaaatga tgacagcatg tcagggagta ggaggacccg 1140

gccataaggc aagagttttg gctgaagcaa tgagccaagt aacaaattca gctaccataa 1200

tgatgcagag aggcaatttt aggaaccaaa gaaagattgt taagtgtttc aattgtggca 1260

aagaagggca cacagccaga aattgcaggg cccctaggaa aaagggctgt tggaaatgtg 1320

gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga 1380

tctggccttc ctacaaggga aggccaggga attttcttca gagcagacca gagccaacag 1440

ccccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactcccccc cagaagcagg 1500

agccgataga caaggaactg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcaacgacc 1560

cctcgtcaca ataatcgcta gcatattatg ctacatatga aaaaaactaa cagatatcat 1620

ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcggt 1680

aggagagata gatgagatcg aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca 1740

agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga 1800

cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc 1860

tgagcaagtt gaaggcttta tacaggggcc tttagatgac tatgcagatg aggaagtgga 1920

tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac 1980

cttacggttg acatcgccag agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac 2040

gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc 2100

atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac 2160

tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta tcagatgttt ggtctctctc 2220

aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt 2280

ggatgaattg ttctcatcta gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc 2340

tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt 2400

caaatattct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc 2460

aatccattca tcatgagttc cttaaagaag attctcggtc tgaaggggaa aggtaagaaa 2520

tctaagaaat tagggatcgc accacccccc tatgaagagg acactagcat ggagtatgct 2580

ccgagcgctc caattgacaa atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg 2640

aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt 2700

ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc 2760

ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt ttttgggttc ttctaatcta 2820

aaggccactc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa 2880

ggcagggctt atttgcaaca taggatgggg aagacccctc ccatgctcaa tgtaccagag 2940

cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc 3000

atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc 3060

aaattttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc tgattgtcga gaaaaaggca 3120

tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc 3180

ttctgaacaa tccccggttt actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata 3240

tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca 3300

agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg 3360

aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc tctttacatc aatactacaa 3420

aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa 3480

tcatacatgt caacagctac ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata 3540

aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg 3600

accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca 3660

gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact tggcttatac agagtgggca 3720

gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa 3780

tgatcaatga acagtttgaa cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg 3840

gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca 3900

aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg 3960

ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg aatgtctaca gaagatgtaa 4020

cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc 4080

aagaaattga caaggccgat tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta 4140

agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc 4200

ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat 4260

ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg atcctctgcc gacttggcac 4320

aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga 4380

ctaatgcacc gccacaaggc agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa 4440

acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag 4500

gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata 4560

attctcagat cacctattat atattatgct acatatgaaa aaaactaaca gagatcgatc 4620

tgtttacgcg tcactatgaa gtgccttttg tacttagcct ttttattcat tggggtgaat 4680

tgcaagttca ccatagtttt tccacacaac caaaaaggaa actggaaaaa tgttccttct 4740

aattaccatt attgcccgtc aagctcagat ttaaattggc ataatgactt aataggcaca 4800

gccttacaag tcaaaatgcc caagagtcac aaggctattc gagcagacgg ttggatgtgt 4860

catgcttcca aatgggtcac tacttgtgat ttccgttggt atggaccgaa gtatataaca 4920

cattccatcc gatccttcac tccatctgta gaacaatgca atgaaagcat tgaacaaacg 4980

aaacaaggaa cttggctgaa tccaggcttc cctcctcaaa gttgtggata tgcaactgtg 5040

acggatgccg aagcagtgat tgtccaggtg actcctcacc atgtgctggt tgatgaatac 5100

acaggagaat gggttgattc acagttcatc aacggaaaat gcagcaatta catatgcccc 5160

actgtccata actctacaac ctggcattct gactataagg tcaaagggct atgtgattct 5220

aacctcattt ccatggacat caccttcttc tcagaggacg gagagctatc atccctggga 5280

aaggagggca cagggttcag aagtacctac tttgcttatg aaactggagg caaggcctgc 5340

aaaatgcaat actgcaagca ttggggagtc agactcccat caggtgtctg gttcgagatg 5400

gctgataagg atctctttgc tgcagccaga ttccctgaat gcccagaagg gtcaagtatc 5460

tctgctccat ctcagacctc agtggatgta agtctaattc aggacgttga gaggatcttg 5520

gattattccc tctgccaaga aacctggagc aaaatcagag cgggtcttcc aatctctcca 5580

gtggatctca gctatcttgc tcctaaaaac ccaggaaccg gtcctgcttt caccataatc 5640

aatggtaccc taaaatactt tgagaccaga tacatcagag tcgatattgc tgctccaatc 5700

ctctcaagaa tggtcggaat gatcagtgga actaccacag aaagggaact gtgggatgac 5760

tgggcaccat atgaagacgt ggaaattgga cccaatggag ttctgaggac cagttcagga 5820

tataagtttc ctttatacat gattggacat ggtatgttgg actccgatct tcatcttagc 5880

tcaaaggctc aggtgttcga acatcctcac attcaagacg ctgcttcgca acttcctgat 5940

gatgagattt tatttttgg tgatactggg ctatccaaaa atccaatcga gcttgtagaa 6000

ggttggttca gtagttggaa aagctctatt gcctcttttt tctttatcat agggttaatc 6060

attgtactat tcttggttct ccgataagct agccgcctag ccagattctt catgtttgga 6120

ccaaatcaac ttgtgatacc atgctcaaag aggcctcaat tatatttgag tttttaattt 6180

ttatgaaaaa aactaacagc aatcatggaa gtccacgatt ttgagaccga cgagttcaat 6240

gatttcaatg aagatgacta tgccacaaga gaattcctga atcccgatga gcgcatgacg 6300

tacttgaatc atgctgatta caacctgaat tctcctctaa ttagtgatga tattgacaat 6360

ttaatcagga aattcaattc tcttccaatt ccctcgatgt gggatagtaa gaactgggat 6420

ggagttcttg agatgttaac gtcatgtcaa gccaatccca tcccaacatc tcagatgcat 6480

aaatggatgg gaagttggtt aatgtctgat aatcatgatg ccagtcaagg gtatagtttt 6540

ttacatgaag tggacaaaga ggcagaaata acatttgacg tggtggagac cttcatccgc 6600

ggctggggca acaaaccaat tgaatacatc aaaaaggaaa gatggactga ctcattcaaa 6660

attctcgctt atttgtgtca aaagtttttg gacttacaca agttgacatt aatcttaaat 6720

gctgtctctg aggtggaatt gctcaacttg gcgaggactt tcaaaggcaa agtcagaaga 6780

agttctcatg gaacgaacat atgcaggatt agggttctca gcttgggtcc tacttttatt 6840

tcagaaggat gggcttactt caagaaactt gatattctaa tggaccgaaa ctttctgtta 6900

atggtcaaag atgtgattat agggaggatg caaacggtgc tatccatggt atgtagaata 6960

gacaacctgt tctcagagca agacatcttc tcccttctaa atatctacag aattggagat 7020

aaaattgtgg agaggcaggg aaatttttct tatgacttga ttaaaatggt ggaaccgata 7080

tgcaacttga agctaatgaa attagcaaga gaatcaaggc ctttagtccc acaattccct 7140

cattttgaaa atcatatcaa gacttctgtt gatgaagggg caaaaattga ccgaggtata 7200

agattcctcc atgatcagat aatgagtgtg aaaacagtgg atctcacact ggtgatttat 7260

ggatcgttca gacattgggg tcatcctttt atagattatt acactggact agaaaaatta 7320

cattcccaag taaccatgaa gaaagatatt gatgtgtcat atgcaaaagc acttgcaagt 7380

gatttagctc ggattgttct atttcaacag ttcaatgatc ataaaaagtg gttcgtgaat 7440

ggagacttgc tccctcatga tcatcccttt aaaagtcatg ttaaagaaaa tacatggccc 7500

acagctgctc aagttcaaga ttttggagat aaatggcatg aacttccgct gattaaatgt 7560

tttgaaatac ccgacttact agacccatcg ataatatact ctgacaaaag tcattcaatg 7620

aataggtcag aggtgttgaa acatgtccga atgaatccga acactcctat ccctagtaaa 7680

aaggtgttgc agactatgtt ggacacaaag gctaccaatt ggaaagaatt tcttaaagag 7740

attgatgaga agggcttaga tgatgatgat ctaattattg gtcttaaagg aaaggagagg 7800

gaactgaagt tggcaggtag atttttctcc ctaatgtctt ggaaattgcg agaatacttt 7860

gtaattaccg aatatttgat aaagactcat ttcgtcccta tgtttaaagg cctgacaatg 7920

gcggacgatc taactgcagt cattaaaaag atgttagatt cctcatccgg ccaaggattg 7980

aagtcatatg aggcaatttg catagccaat cacattgatt acgaaaaatg gaataaccac 8040

caaaggaagt tatcaaacgg cccagtgttc cgagttatgg gccagttctt aggttatcca 8100

tccttaatcg agagaactca tgaatttttt gagaaaagtc ttatatacta caatggaaga 8160

ccagacttga tgcgtgttca caacaacaca ctgatcaatt caacctccca acgagtttgt 8220

tggcaaggac aagagggtgg actggaaggt ctacggcaaa aaggatggag tatcctcaat 8280

ctactggtta ttcaaagaga ggctaaaatc agaaacactg ctgtcaaagt cttggcacaa 8340

ggtgataatc aagttatttg cacacagtat aaaacgaaga aatcgagaaa cgttgtagaa 8400

ttacagggtg ctctcaatca aatggtttct aataatgaga aaattatgac tgcaatcaaa 8460

atagggacag ggaagttagg acttttgata aatgacgatg agactatgca atctgcagat 8520

tacttgaatt atggaaaaat accgattttc cgtggagtga ttagagggtt agagaccaag 8580

agatggtcac gagtgacttg tgtcaccaat gaccaaatac ccacttgtgc taatataatg 8640

agctcagttt ccacaaatgc tctcaccgta gctcattttg ctgagaaccc aatcaatgcc 8700

atgatacagt acaattattt tgggacattt gctagactct tgttgatgat gcatgatcct 8760

gctcttcgtc aatcattgta tgaagttcaa gataagatac cgggcttgca cagttctact 8820

ttcaaatacg ccatgttgta tttggaccct tccattggag gagtgtcggg catgtctttg 8880

tccaggtttt tgattagagc cttcccagat cccgtaacag aaagtctctc attctggaga 8940

ttcatccatg tacatgctcg aagtgagcat ctgaaggaga tgagtgcagt atttggaaac 9000

cccgagatag ccaagtttcg aataactcac atagacaagc tagtagaaga tccaacctct 9060

ctgaacatcg ctatgggaat gagtccagcg aacttgttaa agactgaggt taaaaaatgc 9120

ttaatcgaat caagacaaac catcaggaac caggtgatta aggatgcaac catatatttg 9180

tatcatgaag aggatcggct cagaagtttc ttatggtcaa taaatcctct gttccctaga 9240

tttttaagtg aattcaaatc aggcactttt ttgggagtcg cagacgggct catcagtcta 9300

tttcaaaatt ctcgtactat tcggaactcc tttaagaaaa agtatcatag ggaattggat 9360

gatttgattg tgaggagtga ggtatcctct ttgacacatt tagggaaact tcatttgaga 9420

aggggatcat gtaaaatgtg gacatgttca gctactcatg ctgacacatt aagatacaaa 9480

tcctggggcc gtacagttat tgggacaact gtaccccatc cattagaaat gttgggtcca 9540

caacatcgaa aagagactcc ttgtgcacca tgtaacacat cagggttcaa ttatgtttct 9600

gtgcattgtc cagacgggat ccatgacgtc tttagttcac ggggaccatt gcctgcttat 9660

ctagggtcta aaacatctga atctacatct attttgcagc cttgggaaag ggaaagcaaa 9720

gtcccactga ttaaaagagc tacacgtctt agagatgcta tctcttggtt tgttgaaccc 9780

gactctaaac tagcaatgac tatactttct aacatccact ctttaacagg cgaagaatgg 9840

accaaaaggc agcatgggtt caaaagaaca gggtctgccc ttcataggtt ttcgacatct 9900

cggatgagcc atggtgggtt cgcatctcag agcactgcag cattgaccag gttgatggca 9960

actacagaca ccatgaggga tctgggagat cagaatttcg actttttatt ccaagcaacg 10020

ttgctctatg ctcaaattac caccactgtt gcaagagacg gatggatcac cagttgtaca 10080

gatcattatc atattgcctg taagtcctgt ttgagaccca tagaagagat caccctggac 10140

tcaagtatgg actacacgcc cccagatgta tcccatgtgc tgaagacatg gaggaatggg 10200

gaaggttcgt ggggacaaga gataaaacag atctatcctt tagaagggaa ttggaagaat 10260

ttagcacctg ctgagcaatc ctatcaagtc ggcagatgta taggttttct atatggagac 10320

ttggcgtata gaaaatctac tcatgccgag gacagttctc tatttcctct atctatacaa 10380

ggtcgtatta gaggtcgagg tttcttaaaa gggttgctag acggattaat gagagcaagt 10440

tgctgccaag taatacaccg gagaagtctg gctcatttga agaggccggc caacgcagtg 10500

tacggaggtt tgatttactt gattgataaa ttgagtgtat cacctccatt cctttctctt 10560

actagatcag gacctattag agacgaatta gaaacgattc cccacaagat cccaacctcc 10620

tatccgacaa gcaaccgtga tatgggggtg attgtcagaa attacttcaa ataccaatgc 10680

cgtctaattg aaaagggaaa atacagatca cattattcac aattatggtt attctcagat 10740

gtcttatcca tagacttcat tggaccattc tctatttcca ccaccctctt gcaaatccta 10800

tacaagccat ttttatctgg gaaagataag aatgagttga gagagctggc aaatctttct 10860

tcattgctaa gatcaggaga ggggtgggaa gacatacatg tgaaattctt caccaaggac 10920

atattattgt gtccagagga aatcagacat gcttgcaagt tcgggattgc taaggataat 10980

aataaagaca tgagctatcc cccttgggga agggaatcca gagggacaat tacaacaatc 11040

cctgtttatt atacgaccac cccttaccca aagatgctag agatgcctcc aagaatccaa 11100

aatcccctgc tgtccggaat caggttgggc caattaccaa ctggcgctca ttataaaatt 11160

cggagtatat tacatggaat gggaatccat tacagggact tcttgagttg tggagacggc 11220

tccggaggga tgactgctgc attactacga gaaaatgtgc atagcagagg aatattcaat 11280

agtctgttag aattatcagg gtcagtcatg cgaggcgcct ctcctgagcc ccccagtgcc 11340

ctagaaactt taggaggaga taaatcgaga tgtgtaaatg gtgaaacatg ttgggaatat 11400

ccatctgact tatgtgaccc aaggacttgg gactatttcc tccgactcaa agcaggcttg 11460

gggcttcaaa ttgatttaat tgtaatggat atggaagttc gggattcttc tactagcctg 11520

aaaattgaga cgaatgttag aaattatgtg caccggattt tggatgagca aggagtttta 11580

atctacaaga cttatggaac atatatttgt gagagcgaaa agaatgcagt aacaatcctt 11640

ggtcccatgt tcaagacggt cgacttagtt caaacagaat ttagtagttc tcaaacgtct 11700

gaagtatata tggtatgtaa aggtttgaag aaattaatcg atgaacccaa tcccgattgg 11760

tcttccatca atgaatcctg gaaaaacctg tacgcattcc agtcatcaga acaggaattt 11820

gccagagcaa agaaggttag tacatacttt accttgacag gtattccctc ccaattcatt 11880

cctgatcctt ttgtaaacat tgagactatg ctacaaatat tcggagtacc cacgggtgtg 11940

tctcatgcgg ctgccttaaa atcatctgat agacctgcag atttattgac cattagcctt 12000

ttttatatgg cgattatatc gtattataac atcaatcata tcagagtagg accgatacct 12060

ccgaaccccc catcagatgg aattgcacaa aatgtgggga tcgctataac tggtataagc 12120

ttttggctga gtttgatgga gaaagacatt ccactatatc aacagtgttt agcagttatc 12180

cagcaatcat tcccgattag gtgggaggct gtttcagtaa aaggaggata caagcagaag 12240

tggagtacta gaggtgatgg gctcccaaaa gatacccgaa tttcagactc cttggcccca 12300

atcgggaact ggatcagatc tctggaattg gtccgaaacc aagttcgtct aaatccattc 12360

aatgagatct tgttcaatca gctatgtcgt acagtggata atcatttgaa atggtcaaat 12420

ttgcgaagaa acacaggaat gattgaatgg atcaatagac gaatttcaaa agaagaccgg 12480

tctatactga tgttgaagag tgacctacac gaggaaaact cttggagaga ttaaaaaatc 12540

atgaggagac tccaaacttt aagtatgaaa aaaactttga tccttaagac cctcttgtgg 12600

tttttatttt tttatctggt tttgtggtct tcgtgggtcg gcatggcatc tccacctcct 12660

cgcggtccga cctgggcatc cgaaggagga cgtcgtccac tcggatggct aagggagggg 12720

cccccgcggg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga 12780

gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa 12840

aggaggaact atatccggat cgagacctcg atactagtgc ggtggagctc cagcttttgt 12900

tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg 12960

tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa 13020

gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct 13080

ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 13140

ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc 13200

gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa 13260

tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 13320

aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 13380

aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 13440

cccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 13500

tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 13560

agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 13620

gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta 13680

tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 13740

acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 13800

tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 13860

caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 13920

aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 13980

aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 14040

ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 14100

agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 14160

atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 14220

cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 14280

aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc 14340

cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc 14400

aacgttgttg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 14460

ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa 14520

gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 14580

ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 14640

tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 14700

tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 14760

ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 14820

tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 14880

agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg 14940

acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 15000

ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 15060

gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctaaattgt aagcgttaat attttgttaa 15120

aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa ccaataggcc gaaatcggca 15180

aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttgga 15240

acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc 15300

agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag ttttttgggg tcgaggtgcc 15360

gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt tagagcttga cggggaaagc 15420

cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg agcgggcgct agggcgctgg 15480

caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc cgcgcttaat gcgccgctac 15540

agggcgcgtc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg 15600

cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg 15660

taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatacg 15720

actcactata gg 15732

<210> 2
<211> 4007
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 2

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Sequence Listing

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys
770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr
885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys
1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg
1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu
1400 1405 1410

Phe Asp Lys Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly
1415 1420 1425

Val Asn Cys Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly
1430 1435 1440

Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser
1445 1450 1455

Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln
1460 1465 1470

Val Lys Met Pro Lys Ser His Lys Ala Ile Arg Ala Asp Gly Trp
1475 1480 1485

Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp
1490 1495 1500

Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro
1505 1510 1515

Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly
1520 1525 1530

Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala
1535 1540 1545

Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His
1550 1555 1560

His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln
1565 1570 1575

Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His
1580 1585 1590

Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys
1595 1600 1605

Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
1610 1615 1620

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser
1625 1630 1635

Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln
1640 1645 1650

Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe
1655 1660 1665

Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu
1670 1675 1680

Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val
1685 1690 1695

Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser
1700 1705 1710

Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile
1715 1720 1725

Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr
1730 1735 1740

Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu
1745 1750 1755

Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg
1760 1765 1770

Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp
1775 1780 1785

Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly
1790 1795 1800

Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile
1805 1810 1815

Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala
1820 1825 1830

Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu
1835 1840 1845

Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
1850 1855 1860

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
1865 1870 1875

Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu
1880 1885 1890

Phe Leu Val Leu Arg Met Glu Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu
1895 1900 1905

Phe Asn Asp Phe Asn Glu Asp Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu
1910 1915 1920

Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn
1925 1930 1935

Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg
1940 1945 1950

Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn
1955 1960 1965

Trp Asp Gly Val Leu Glu Met Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro
1970 1975 1980

Ile Pro Thr Ser Gln Met His Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met
1985 1990 1995

Ser Asp Asn His Asp Ala Ser Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu
2000 2005 2010

Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe
2015 2020 2025

Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu
2030 2035 2040

Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys
2045 2050 2055

Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser
2060 2065 2070

Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val
2075 2080 2085

Arg Arg Ser Ser His Gly Thr Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro
2090 2095 2100

Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys
2105 2110 2115

Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys
2120 2125 2130

Asp Val Ile Ile Gly Arg Met Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys
2135 2140 2145

Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu
2150 2155 2160

Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn
2165 2170 2175

Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu
2180 2185 2190

Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln
2195 2200 2205

Phe Pro His Phe Glu Asn His Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly
2210 2215 2220

Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met
2225 2230 2235

Ser Val Lys Thr Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe
2240 2245 2250

Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu
2255 2260 2265

Lys Leu His Ser Gln Val Thr Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser
2270 2275 2280

Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe
2285 2290 2295

Gln Gln Phe Asn Asp His Lys Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu
2300 2305 2310

Leu Pro His Asp His Pro Phe Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr
2315 2320 2325

Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His
2330 2335 2340

Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp
2345 2350 2355

Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser
2360 2365 2370

Glu Val Leu Lys His Val Arg Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro
2375 2380 2385

Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn
2390 2395 2400

Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp
2405 2410 2415

Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys
2420 2425 2430

Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu
2435 2440 2445

Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro
2450 2455 2460

Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile
2465 2470 2475

Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr
2480 2485 2490

Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn
2495 2500 2505

Asn His Gln Arg Lys Leu Ser Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met
2510 2515 2520

Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu
2525 2530 2535

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu
2540 2545 2550

Met Arg Val His Asn Asn Thr Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg
2555 2560 2565

Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln
2570 2575 2580

Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala
2585 2590 2595

Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn
2600 2605 2610

Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val
2615 2620 2625

Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu
2630 2635 2640

Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu
2645 2650 2655

Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn
2660 2665 2670

Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu
2675 2680 2685

Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile
2690 2695 2700

Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu
2705 2710 2715

Thr Val Ala His Phe Ala Glu Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln
2720 2725 2730

Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His
2735 2740 2745

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile
2750 2755 2760

Pro Gly Leu His Ser Ser Thr Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu
2765 2770 2775

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe
2780 2785 2790

Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe
2795 2800 2805

Trp Arg Phe Ile His Val His Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu
2810 2815 2820

Met Ser Ala Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile
2825 2830 2835

Thr His Ile Asp Lys Leu Val Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile
2840 2845 2850

Ala Met Gly Met Ser Pro Ala Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys
2855 2860 2865

Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile
2870 2875 2880

Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg
2885 2890 2895

Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser
2900 2905 2910

Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile
2915 2920 2925

Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys
2930 2935 2940

Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val
2945 2950 2955

Ser Ser Leu Thr His Leu Gly Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser
2960 2965 2970

Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg
2975 2980 2985

Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His
2990 2995 3000

Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys
3005 3010 3015

Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys
3020 3025 3030

Pro Asp Gly Ile His Asp Val Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro
3035 3040 3045

Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln
3050 3055 3060

Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr
3065 3070 3075

Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys
3080 3085 3090

Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu
3095 3100 3105

Glu Trp Thr Lys Arg Gln His Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala
3110 3115 3120

Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala
3125 3130 3135

Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp
3140 3145 3150

Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln
3155 3160 3165

Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp
3170 3175 3180

Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys
3185 3190 3195

Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met
3200 3205 3210

Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg
3215 3220 3225

Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro
3230 3235 3240

Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr
3245 3250 3255

Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr
3260 3265 3270

Arg Lys Ser Thr His Ala Glu Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser
3275 3280 3285

Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu
3290 3295 3300

Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg
3305 3310 3315

Ser Leu Ala His Leu Lys Arg Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly
3320 3325 3330

Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu
3335 3340 3345

Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile
3350 3355 3360

Pro His Lys Ile Pro Thr Ser Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met
3365 3370 3375

Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile
3380 3385 3390

Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe
3395 3400 3405

Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser
3410 3415 3420

Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys
3425 3430 3435

Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu
3440 3445 3450

Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr
3455 3460 3465

Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys
3470 3475 3480

Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro
3485 3490 3495

Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr
3500 3505 3510

Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg
3515 3520 3525

Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro
3530 3535 3540

Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly
3545 3550 3555

Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly
3560 3565 3570

Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile
3575 3580 3585

Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala
3590 3595 3600

Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys
3605 3610 3615

Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp
3620 3625 3630

Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala
3635 3640 3645

Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val
3650 3655 3660

Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn
3665 3670 3675

Tyr Val His Arg Ile Leu Asp Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys
3680 3685 3690

Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr
3695 3700 3705

Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu
3710 3715 3720

Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly
3725 3730 3735

Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile
3740 3745 3750

Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln
3755 3760 3765

Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
3770 3775 3780

Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu
3785 3790 3795

Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala
3800 3805 3810

Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile
3815 3820 3825

Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His
3830 3835 3840

Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile
3845 3850 3855

Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu
3860 3865 3870

Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala
3875 3880 3885

Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val
3890 3895 3900

Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu
3905 3910 3915

Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn
3920 3925 3930

Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn
3935 3940 3945

Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp
3950 3955 3960

Asn His Leu Lys Trp Ser Asn Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile
3965 3970 3975

Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu
3980 3985 3990

Met Leu Lys Ser Asp Leu His Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
3995 4000 4005

<210> 3
<211> 4007
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 3

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn

65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly

340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu

610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys
770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr

885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Gln His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys

1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg
1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu

1400 1405 1410

Phe Asp Lys Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly
1415 1420 1425

Val Asn Cys Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly
1430 1435 1440

Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser
1445 1450 1455

Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln
1460 1465 1470

Val Lys Met Pro Lys Ser His Lys Ala Ile Arg Ala Asp Gly Trp
1475 1480 1485

Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp
1490 1495 1500

Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro
1505 1510 1515

Ser Val Glu Gln Cys Asn Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly
1520 1525 1530

Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala
1535 1540 1545

Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His
1550 1555 1560

His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln
1565 1570 1575

Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His
1580 1585 1590

Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys
1595 1600 1605

Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
1610 1615 1620

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser
1625 1630 1635

Thr Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln
1640 1645 1650

Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe

1655 1660 1665

Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu
1670 1675 1680

Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val
1685 1690 1695

Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser
1700 1705 1710

Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile
1715 1720 1725

Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr
1730 1735 1740

Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu
1745 1750 1755

Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg
1760 1765 1770

Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp
1775 1780 1785

Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly
1790 1795 1800

Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile
1805 1810 1815

Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala
1820 1825 1830

Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu
1835 1840 1845

Pro Asp Asp Glu Ile Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
1850 1855 1860

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
1865 1870 1875

Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Val Leu
1880 1885 1890

Phe Leu Ile Leu Arg Met Glu Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu
1895 1900 1905

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

1910 1915 1920

Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn
1925 1930 1935

Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg
1940 1945 1950

Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn
1955 1960 1965

Trp Asp Gly Val Leu Glu Met Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro
1970 1975 1980

Ile Pro Thr Ser Gln Met His Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met
1985 1990 1995

Ser Asp Asn His Asp Ala Ser Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu
2000 2005 2010

Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe
2015 2020 2025

Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu
2030 2035 2040

Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys
2045 2050 2055

Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser
2060 2065 2070

Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val
2075 2080 2085

Arg Arg Ser Ser His Gly Thr Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Leu
2090 2095 2100

Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys
2105 2110 2115

Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys
2120 2125 2130

Asp Val Ile Ile Gly Arg Met Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys
2135 2140 2145

Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu
2150 2155 2160

Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn

2165 2170 2175

Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu
2180 2185 2190

Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln
2195 2200 2205

Phe Pro His Phe Glu Asn His Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly
2210 2215 2220

Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met
2225 2230 2235

Ser Val Lys Thr Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe
2240 2245 2250

Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu
2255 2260 2265

Lys Leu His Ser Gln Val Thr Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser
2270 2275 2280

Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe
2285 2290 2295

Gln Gln Phe Asn Asp His Lys Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu
2300 2305 2310

Leu Pro His Asp His Pro Phe Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr
2315 2320 2325

Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His
2330 2335 2340

Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp
2345 2350 2355

Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser
2360 2365 2370

Glu Val Leu Lys His Val Arg Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro
2375 2380 2385

Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn
2390 2395 2400

Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp
2405 2410 2415

Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys

2420 2425 2430

Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu
2435 2440 2445

Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro
2450 2455 2460

Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile
2465 2470 2475

Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr
2480 2485 2490

Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn
2495 2500 2505

Asn His Gln Arg Lys Leu Ser Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met
2510 2515 2520

Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu
2525 2530 2535

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu
2540 2545 2550

Met Arg Val His Asn Asn Thr Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg
2555 2560 2565

Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln
2570 2575 2580

Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala
2585 2590 2595

Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn
2600 2605 2610

Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val
2615 2620 2625

Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu
2630 2635 2640

Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu
2645 2650 2655

Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn
2660 2665 2670

Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu

2675 2680 2685

Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile
2690 2695 2700

Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu
2705 2710 2715

Thr Val Ala His Phe Ala Glu Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln
2720 2725 2730

Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His
2735 2740 2745

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile
2750 2755 2760

Pro Gly Leu His Ser Ser Thr Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu
2765 2770 2775

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe
2780 2785 2790

Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe
2795 2800 2805

Trp Arg Phe Ile His Val His Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu
2810 2815 2820

Met Ser Ala Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile
2825 2830 2835

Thr His Ile Asp Lys Leu Val Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile
2840 2845 2850

Ala Met Gly Met Ser Pro Ala Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys
2855 2860 2865

Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile
2870 2875 2880

Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg
2885 2890 2895

Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser
2900 2905 2910

Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile
2915 2920 2925

Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys

2930 2935 2940

Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val
2945 2950 2955

Ser Ser Leu Thr His Leu Gly Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser
2960 2965 2970

Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg
2975 2980 2985

Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His
2990 2995 3000

Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys
3005 3010 3015

Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys
3020 3025 3030

Pro Asp Gly Ile His Asp Val Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro
3035 3040 3045

Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln
3050 3055 3060

Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr
3065 3070 3075

Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys
3080 3085 3090

Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu
3095 3100 3105

Glu Trp Thr Lys Arg Gln His Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala
3110 3115 3120

Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala
3125 3130 3135

Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp
3140 3145 3150

Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln
3155 3160 3165

Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp
3170 3175 3180

Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys

3185 3190 3195

Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met
3200 3205 3210

Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg
3215 3220 3225

Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro
3230 3235 3240

Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr
3245 3250 3255

Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr
3260 3265 3270

Arg Lys Ser Thr His Ala Glu Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser
3275 3280 3285

Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu
3290 3295 3300

Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg
3305 3310 3315

Ser Leu Ala His Leu Lys Arg Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly
3320 3325 3330

Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu
3335 3340 3345

Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile
3350 3355 3360

Pro His Lys Ile Pro Thr Ser Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met
3365 3370 3375

Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile
3380 3385 3390

Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe
3395 3400 3405

Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser
3410 3415 3420

Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys
3425 3430 3435

Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu

3440 3445 3450

Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr
3455 3460 3465

Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys
3470 3475 3480

Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro
3485 3490 3495

Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr
3500 3505 3510

Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg
3515 3520 3525

Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro
3530 3535 3540

Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly
3545 3550 3555

Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly
3560 3565 3570

Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile
3575 3580 3585

Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala
3590 3595 3600

Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys
3605 3610 3615

Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp
3620 3625 3630

Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala
3635 3640 3645

Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val
3650 3655 3660

Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn
3665 3670 3675

Tyr Val His Arg Ile Leu Asp Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys
3680 3685 3690

Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr

3695 3700 3705

Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu
3710 3715 3720

Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly
3725 3730 3735

Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile
3740 3745 3750

Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln
3755 3760 3765

Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
3770 3775 3780

Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu
3785 3790 3795

Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala
3800 3805 3810

Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile
3815 3820 3825

Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His
3830 3835 3840

Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile
3845 3850 3855

Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu
3860 3865 3870

Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala
3875 3880 3885

Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val
3890 3895 3900

Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu
3905 3910 3915

Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn
3920 3925 3930

Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn
3935 3940 3945

Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp

3950 3955 3960

Asn His Leu Lys Trp Ser Asn Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile
3965 3970 3975

Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu
3980 3985 3990

Met Leu Lys Ser Asp Leu His Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
3995 4000 4005

<210> 4
<211> 15752
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 4
acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc 60

aaactcgagg gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgatggg 120

aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg 180

caagcaggga gctagaacga ttcgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct 240

gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat 300

cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca 360

ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa aagtaagaaa aaagcacagc 420

aagcagcagc tgacacagga cacagcaatc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga 480

acatccaggg gcaaatggta catcaggcca tatcacctag aactttaaat gcatgggtaa 540

aagtagtaga agagaaggct ttcggcccag aagtgatacc catgttttca gcattatcag 600

aaggagccac cccacaagat ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag 660

ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc agaatgggat agagtgcatc 720

cagtgcatgc agggcctatt gcaccaggcc agatgagaga accaagggga agtgacatag 780

caggaactac tagtaccctt caggaacaaa taggatggat gacaaataat ccacctatcc 840

cagtaggaga aatttataaa agatggataa tcctgggatc aaataaaata gtaagaatgt 900

atagccctac cagcattctg gacataagac aaggaccaaa agaacccttt agagactatg 960

tagaccggtt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc acaggaggta aaaaattgga 1020

tgacagaaac cttgttggtc caaaatgcga acccagattg taagactatt ttaaaagcat 1080

tgggaccagc ggctacacta gaagaaatga tgacagcatg tcagggagta ggaggacccg 1140

gccataaggc aagagttttg gctgaagcaa tgagccaagt aacaaattca gctaccataa 1200

tgatgcagag aggcaatttt aggaaccaaa gaaagattgt taagtgtttc aattgtggca 1260

aagaagggca cacagccaga aattgcaggg cccctaggaa aaagggctgt tggaaatgtg 1320

gaaaggaagg acaccaaatg aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttagggaaga 1380

tctggccttc ctacaaggga aggccaggga attttcttca gagcagacca gagccaacag 1440

ccccaccaga agagagcttc aggtctgggg tagagacaac aactcccccc cagaagcagg 1500

agccgataga caaggaactg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcaacgacc 1560

cctcgtcaca ataatcgcta gcatattatg ctacatatga aaaaaactaa cagatatcat 1620

ggataatctc acaaaagttc gtgagtatct caagtcctat tctcgtctgg atcaggcggt 1680

aggagagata gatgagatcg aagcacaacg agctgaaaag tccaattatg agttgttcca 1740

agaggatgga gtggaagagc atactaagcc ctcttatttt caggcagcag atgattctga 1800

cacagaatct gaaccagaaa ttgaagacaa tcaaggcttg tatgcaccag atccagaagc 1860

tgagcaagtt gaaggcttta tacaggggcc tttagatgac tatgcagatg aggaagtgga 1920

tgttgtattt acttcggact ggaaacagcc tgagcttgaa tctgacgagc atggaaagac 1980

cttacggttg acatcgccag agggtttaag tggagagcag aaatcccagt ggctttcgac 2040

gattaaagca gtcgtgcaaa gtgccaaata ctggaatctg gcagagtgca catttgaagc 2100

atcgggagaa ggggtcatta tgaaggagcg ccagataact ccggatgtat ataaggtcac 2160

tccagtgatg aacacacatc cgtcccaatc agaagcagta tcagatgttt ggtctctctc 2220

aaagacatcc atgactttcc aacccaagaa agcaagtctt cagcctctca ccatatcctt 2280

ggatgaattg ttctcatcta gaggagagtt catctctgtc ggaggtgacg gacgaatgtc 2340

tcataaagag gccatcctgc tcggcctgag atacaaaaag ttgtacaatc aggcgagagt 2400

caaatattct ctgtagacta tgaaaaaaag taacagatat cacgatctaa gtgttatccc 2460

aatccattca tcatgagttc cttaaagaag attctcggtc tgaaggggaa aggtaagaaa 2520

tctaagaaat tagggatcgc accacccccc tatgaagagg acactagcat ggagtatgct 2580

ccgagcgctc caattgacaa atcctatttt ggagttgacg agatggacac ctatgatccg 2640

aatcaattaa gatatgagaa attcttcttt acagtgaaaa tgacggttag atctaatcgt 2700

ccgttcagaa catactcaga tgtggcagcc gctgtatccc attgggatca catgtacatc 2760

ggaatggcag ggaaacgtcc cttctacaaa atcttggctt ttttgggttc ttctaatcta 2820

aaggccaatc cagcggtatt ggcagatcaa ggtcaaccag agtatcacgc tcactgcgaa 2880

ggcagggctt atttgacaca taggatgggg aagacccctc ccatgctcaa tgtaccagag 2940

cacttcagaa gaccattcaa tataggtctt tacaagggaa cgattgagct cacaatgacc 3000

atctacgatg atgagtcact ggaagcagct cctatgatct gggatcattt caattcttcc 3060

aaatttttctg atttcagaga gaaggcctta atgtttggcc tgattgtcga gaaaaaggca 3120

tctggagcgt gggtcctgga ctctatcggc cacttcaaat gagctagtct aacttctagc 3180

ttctgaacaa tccccggttt actcagtctc ccctaattcc agcctctcga acaactaata 3240

tcctgtcttt tctatcccta tgaaaaaaac taacagtaat caaaatgtct gttacagtca 3300

agagaatcat tgacaacaca gtcgtagttc caaaacttcc tgcaaatgag gatccagtgg 3360

aatacccggc agattacttc agaaaatcaa aggagattcc tctttacatc aatactacaa 3420

aaagtttgtc agatctaaga ggatatgtct accaaggcct caaatccgga aatgtatcaa 3480

tcatacatgt caacagctac ttgtatggag cattaaagga catccggggt aagttggata 3540

aagattggtc aagtttcgga ataaacatcg ggaaagcagg ggatacaatc ggaatatttg 3600

accttgtatc cttgaaagcc ctggacggcg tacttccaga tggagtatcg gatgcttcca 3660

gaaccagcgc agatgacaaa tggttgcctt tgtatctact tggcttatac agagtgggca 3720

gaacacaaat gcctgaatac agaaaaaagc tcatggatgg gctgacaaat caatgcaaaa 3780

tgatcaatga acagtttgaa cctcttgtgc cagaaggtcg tgacattttt gatgtgtggg 3840

gaaatgacag taattacaca aaaattgtcg ctgcagtgga catgttcttc cacatgttca 3900

aaaaacatga atgtgcctcg ttcagatacg gaactattgt ttccagattc aaagattgtg 3960

ctgcattggc aacatttgga cacctctgca aaataaccgg aatgtctaca gaagatgtaa 4020

cgacctggat cttgaaccga gaagttgcag atgaaatggt ccaaatgatg cttccaggcc 4080

aagaaattga caaggccgat tcatacatgc cttatttgat cgactttgga ttgtcttcta 4140

agtctccata ttcttccgtc aaaaaccctg ccttccactt ctgggggcaa ttgacagctc 4200

ttctgctcag atccaccaga gcaaggaatg cccgacagcc tgatgacatt gagtatacat 4260

ctcttactac agcaggtttg ttgtacgctt atgcagtagg atcctctgcc gacttggcac 4320

aacagttttg tgttggagat aacaaataca ctccagatga tagtaccgga ggattgacga 4380

ctaatgcacc gccacaaggc agagatgtgg tcgaatggct cggatggttt gaagatcaaa 4440

acagaaaacc gactcctgat atgatgcagt atgcgaaaag agcagtcatg tcactgcaag 4500

gcctaagaga gaagacaatt ggcaagtatg ctaagtcaga atttgacaaa tgaccctata 4560

attctcagat cacctattat atattatgtt acatatgaaa aaaactaaca gagatcgatc 4620

tgtttacgcg tcactatgtt gtcttatcta atctttgcac ttgccgtttc gcccattttg 4680

ggcaaaattg aaattgtgtt tcctcaacat accactgggg attggaagag agttccccat 4740

gaatataatt attgccctac cagcgcagac aagaactcac atgggactca aacaggaatc 4800

cctgttgagt taacaatgcc aaaaggacta acaacccatc aagttgaagg atttatgtgt 4860

cactcagcct tgtggatgac cacttgtgac ttcagatggt atgggccaaa atacataacc 4920

cattccatac ataatgaaga gcctacagat tatcaatgtt tggaggccat taagtcatac 4980

aaagatggag tcagtttcaa tccagggttt cctcctcaga gctgcgggta tggcacagtt 5040

accgatgccg aagcccatat tgtgacagtt actccccact ctgtcaaagt ggacgagtac 5100

acgggggaat ggatcgatcc acatttcatc ggaggaaggt gcaaaggaca aatttgtgaa 5160

acagtccata attccacaaa atggtttacg tcctctgatg gagaaagtgt ctgcagtcaa 5220

ttgtttactt tggttggagg aatttttttc tctgattcag aagagattac ctccatgggg 5280

ttaccagaaa caggaatcag aagtaattac ttcccctaca tatctacaga gggaatttgc 5340

aaaatgccgt tttgcagaaa acaggggtac aagcttaaaa atgacctctg gttccagatc 5400

atggacccag acctggataa aacggttaga gatctccctc atattaagga ctgtgacctc 5460

tcctcgtcca taatcacacc aggagaacat gctacagaca tctcactgat atcagatgtt 5520

gaaaggatcc tagactatgc tctttgtcag aatacatgga gtaaaattga atcgggagaa 5580

ccaattactc cggtagatct cagctatctt gggccaaaaa acccaggggt tgggccggtc 5640

ttcaccatca ttaacggttc cctgcattat tttacatcga agtatctgcg agtcgaatta 5700

gaaagtcctg tcatacccag aatggaagga aaagttgcag gaactaggat tgtacggcaa 5760

ttgtgggatc agtggtttcc tttcggagaa gttgagattg gacccaatgg tgtgttgaaa 5820

acgaagcaag ggtataaatt cccactacac atcattggaa ctggagaagt agacagtgac 5880

atcaaaatgg aaagggttgt caagcactgg gaacaccccc atattgaggc cgctcagaca 5940

tttttaaaaa aagatgacac aggagaagtc ctttattatg gcgacaccgg agtgtcgaaa 6000

aatccagttg aattagtcga gggatggttt agtggatgga ggagctccct catgggagtg 6060

ctggttgtga ttataggatt tgtgatttta atgtttttaa ttcgataagc tagccgccta 6120

gccagattct tcatgtttgg accaaatcaa cttgtgatac catgctcaaa gaggcctcaa 6180

ttatatttga gtttttaatt tttatgaaaa aaactaacag caatcatgga agtccacgat 6240

tttgagaccg acgagttcaa tgatttcaat gaagatgact atgccacaag agaattcctg 6300

aatcccgatg agcgcatgac gtacttgaat catgctgatt acaacctgaa ttctcctcta 6360

attagtgatg atattgacaa tttaatcagg aaattcaatt ctcttccaat tccctcgatg 6420

tgggatagta agaactggga tggagttctt gagatgttaa cgtcatgtca agccaatccc 6480

atcccaacat ctcagatgca taaatggatg ggaagttggt taatgtctga taatcatgat 6540

gccagtcaag ggtatagttt tttacatgaa gtggacaaag aggcagaaat aacatttgac 6600

gtggtggaga ccttcatccg cggctggggc aacaaaccaa ttgaatacat caaaaaggaa 6660

agatggactg actcattcaa aattctcgct tatttgtgtc aaaagttttt ggacttacac 6720

aagttgacat taatcttaaa tgctgtctct gaggtggaat tgctcaactt ggcgaggact 6780

ttcaaaggca aagtcagaag aagttctcat ggaacgaaca tatgcaggat tagggttccc 6840

agcttgggtc ctacttttat ttcagaagga tgggcttact tcgagaaact tgatattcta 6900

atggaccgaa actttctgtt aatggtcaaa gatgtgatta tagggaggat gcaaacggtg 6960

ctatccatgg tatgtagaat agacaacctg ttctcagagc aagacatctt ctcccttcta 7020

aatatctaca gaattggaga taaaattgtg gagaggcagg gaaatttttc ttatgacttg 7080

attaaaatgg tggaaccgat atgcaacttg aagctgatga aattagcaag agaatcaagg 7140

cctttagtcc cacaattccc tcattttgaa aatcatatca agacttctgt tgatgaaggg 7200

gcaaaaattg accgaggtat aagattcctc catgatcaga taatgagtgt gaaaacagtg 7260

gatctcacac tggtgattta tggatcgttc agacattggg gtcatccttt tatagattat 7320

tacactggac tagaaaaatt acattcccaa gtaaccatga agaaagatat tgatgtgtca 7380

tatgcaaaag cacttgcaag tgatttagct cggattgttc tatttcaaca gttcaatgat 7440

cataaaaagt ggttcgtgaa tggagacttg ctccctcatg atcatccctt taaaagtcat 7500

gttaaagaaa atacatggcc cacagctgct caagttcaag attttggaga taaatggcat 7560

gaacttccgc tgattaaatg ttttgaaata cccgacttac tagacccatc gataatatac 7620
tctgacaaaa gtcattcaat gaataggtca gaggtgttga aacatgtccg aatgaatccg 7680
aacactccta tccctagtaa aaaggtgttg cagactatgt tggacacaaa ggctaccaat 7740
tggaaagaat ttcttaaaga gattgatgag aagggcttag atgatgatga tctaattatt 7800
ggtcttaaag gaaaggagag ggaactgaag ttggcaggta gatttttctc cctaatgtct 7860
tggaaattgc gagaatactt tgtaattacc gaatatttga taaagactca tttcgtccct 7920
atgtttaaag gcctgacaat ggcggacgat ctaactgcag tcattaaaaa gatgttagat 7980
tcctcatccg gccaaggatt gaagtcatat gaggcaattt gcatagccaa tcacattgat 8040
tacgaaaaat ggaataacca ccaaaggaag ttatcaaacg gcccagtgtt ccgagttatg 8100
ggccagttct taggttatcc atccttaatc gagagaactc atgaattttt tgagaaaagt 8160
cttatatact acaatggaag accagacttg atgcgtgttc acaacaacac actgatcaat 8220
tcaacctccc aacgagtttg ttggcaagga caagagggtg gactggaagg tctacggcaa 8280
aaaggatgga gtatcctcaa tctactggtt attcaaagag aggctaaaat cagaaacact 8340
gctgtcaaag tcttggcaca aggtgataat caagttattt gcacacagta taaaacgaag 8400
aaatcgagaa acgttgtaga attacagggt gctctcaatc aaatggtttc taataatgag 8460
aaaattatga ctgcaatcaa aatagggaca gggaagttag gacttttgat aaatgacgat 8520
gagactatgc aatctgcaga ttacttgaat tatggaaaaa taccgatttt ccgtggagtg 8580
attagagggt tagagaccaa gagatggtca cgagtgactt gtgtcaccaa tgaccaaata 8640
cccacttgtg ctaatataat gagctcagtt tccacaaatg ctctcaccgt agctcatttt 8700
gctgagaacc caatcaatgc catgatacag tacaattatt ttgggacatt tgctagactc 8760
ttgttgatga tgcatgatcc tgctcttcgt caatcattgt atgaagttca agataagata 8820
ccgggcttgc acagttctac tttcaaatac gccatgttgt atttggaccc ttccattgga 8880
ggagtgtcgg gcatgtcttt gtccaggttt ttgattagag ccttcccaga tcccgtaaca 8940
gaaagtctct cattctggag attcatccat gtacatgctc gaagtgagca tctgaaggag 9000
atgagtgcag tatttggaaa ccccgagata gccaagtttc gaataactca catagacaag 9060
ctagtagaag atccaacctc tctgaacatc gctatgggaa tgagtccagc gaacttgtta 9120
aagactgagg ttaaaaaatg cttaatcgaa tcaagacaaa ccatcaggaa ccaggtgatt 9180
aaggatgcaa ccatatattt gtatcatgaa gaggatcggc tcagaagttt cttatggtca 9240
ataaatcctc tgttccctag atttttaagt gaattcaaat caggcacttt tttgggagtc 9300
gcagacgggc tcatcagtct atttcaaaat tctcgtacta ttcggaactc ctttaagaaa 9360
aagtatcata gggaattgga tgatttgatt gtgaggagtg aggtatcctc tttgacacat 9420
ttagggaaac ttcatttgag aaggggatca tgtaaaatgt ggacatgttc agctactcat 9480
gctgacacat taagatacaa atcctggggc cgtacagtta ttgggacaac tgtaccccat 9540
ccattagaaa tgttgggtcc acaacatcga aaagagactc cttgtgcacc atgtaacaca 9600

tcagggttca attatgtttc tgtgcattgt ccagacggga tccatgacgt ctttagttca 9660

cggggaccat tgcctgctta tctagggtct aaaacatctg aatctacatc tattttgcag 9720

ccttgggaaa gggaaagcaa agtcccactg attaaaagag ctacacgtct tagagatgct 9780

atctcttggt ttgttgaacc cgactctaaa ctagcaatga ctatactttc taacatccac 9840

tctttaacag gcgaagaatg gaccaaaagg cagcatgggt tcaaaagaac agggtctgcc 9900

cttcataggt tttcgacatc tcggatgagc catggtgggt tcgcatctca gagcactgca 9960

gcattgacca ggttgatggc aactacagac accatgaggg atctgggaga tcagaatttc 10020

gacttttat tccaagcaac gttgctctat gctcaaatta ccaccactgt tgcaagagac 10080

ggatggatca ccagttgtac agatcattat catattgcct gtaagtcctg tttgagaccc 10140

atagaagaga tcaccctgga ctcaagtatg gactacacgc ccccagatgt atcccatgtg 10200

ctgaagacat ggaggaatgg ggaaggttcg tggggacaag agataaaaca gatctatcct 10260

ttagaaggga attggaagaa tttagcacct gctgagcaat cctatcaagt cggcagatgt 10320

ataggttttc tatatggaga cttggcgtat agaaaatcta ctcatgccga ggacagttct 10380

ctatttcctc tatctataca aggtcgtatt agaggtcgag gtttcttaaa agggttgcta 10440

gacggattaa tgagagcaag ttgctgccaa gtaatacacc ggagaagtct ggctcatttg 10500

aagaggccgg ccaacgcagt gtacggaggt ttgatttact tgattgataa attgagtgta 10560

tcacctccat tcatttctct tactagatca ggacctatta gagacgaatt agaaacgatt 10620

ccccacaaga tcccaacctc ctatccgaca agcaaccgtg atatgggggt gattgtcaga 10680

aattacttca aataccaatg ccgtctaatt gaaaagggaa aatacagatc acattattca 10740

caattatggt tattctcaga tgtcttatcc atagacttca ttggaccatt ctctatttcc 10800

accaccctct tgcaaatcct atacaagcca tttttatctg ggaaagataa gaatgagttg 10860

agagagctgg caaatctttc ttcattgcta agatcaggag aggggtggga agacatacat 10920

gtgaaattct tcaccaagga catattattg tgtccagagg aaatcagaca tgcttgcaag 10980

ttcgggattg ctaaggataa taataaagac atgagctatc ccccttgggg aagggaatcc 11040

agagggacaa ttacaacaat ccctgtttat tatacgacca ccccttaccc aaagatgcta 11100

gagatgcctc caagaatcca aaatcccctg ctgtccggaa tcaggttggg ccaattacca 11160

actggcgctc attataaaat tcggagtata ttacatggaa tgggaatcca ttacagggac 11220

ttcttgagtt gtggagacgg ctccggaggg atgactgctg cattactacg agaaaatgtg 11280

catagcagag gaatattcaa tagtctgtta gaattatcag ggtcagtcat gcgaggcgcc 11340

tctcctgagc cccccagtgc cctagaaact ttaggaggag ataaatcgag atgtgtaaat 11400

ggtgaaacat gttgggaata tccatctgac ttatgtgacc caaggacttg ggactatttc 11460

ctccgactca aagcaggctt ggggcttcaa attgatttaa ttgtaatgga tatggaagtt 11520

cgggattctt ctactagcct gaaaattgag acgaatgtta gaaattatgt gcaccggatt 11580

ttggatgagc aaggagtttt aatctacaag acttatggaa catatatttg tgagagcgaa 11640

aagaatgcag taacaatcct tggtcccatg ttcaagacgg tcgacttagt tcaaacagaa 11700

tttagtagtt ctcaaacgtc tgaagtatat atggtatgta aaggtttgaa gaaattaatc 11760

gatgaaccca atcccgattg gtcttccatc aatgaatcct ggaaaaacct gtacgcattc 11820

cagtcatcag aacaggaatt tgccagagca aagaaggtta gtacatactt taccttgaca 11880

ggtattccct cccaattcat tcctgatcct tttgtaaaca ttgagactat gctacaaata 11940

ttcggagtac ccacgggtgt gtctcatgcg gctgccttaa aatcatctga tagacctgca 12000

gatttattga ccattagcct tttttatatg gcgattatat cgtattataa catcaatcat 12060

atcagagtag gaccgatacc tccgaacccc ccatcagatg gaattgcaca aaatgtgggg 12120

atcgctataa ctggtataag cttttggctg agtttgatgg agaaagacat tccactatat 12180

caacagtgtt tagcagttat ccagcaatca ttcccgatta ggtgggaggc tgtttcagta 12240

aaaggaggat acaagcagaa gtggagtact agaggtgatg ggctcccaaa agatacccga 12300

atttcagact ccttggcccc aatcgggaac tggatcagat ctctggaatt ggtccgaaac 12360

caagttcgtc taaatccatt caatgagatc ttgttcaatc agctatgtcg tacagtggat 12420

aatcatttga aatggtcaaa tttgcgaaga aacacaggaa tgattgaatg gatcaataga 12480

cgaatttcaa aagaagaccg gtctatactg atgttgaaga gtgacctaca cgaggaaaac 12540

tcttggagag attaaaaaat catgaggaga ctccaaactt taagtatgaa aaaaactttg 12600

atccttaaga ccctcttgtg gtttttattt tttatctggt tttgtggtct tcgtgggtcg 12660

gcatggcatc tccacctcct cgcggtccga cctgggcatc cgaaggagga cgtcgtccac 12720

tcggatggct aagggagggg cccccgcggg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag 12780

ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc 12840

ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact atatccggat cgagacctcg atactagtgc 12900

ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat 12960

ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 13020

ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg 13080

cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 13140

tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca 13200

ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg 13260

taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 13320

agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 13380

cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 13440

tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc 13500

tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata 13560

gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 13620

acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 13680

acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 13740

cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta 13800

gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 13860

gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc 13920

agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 13980

ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 14040

ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 14100

atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 14160

tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 14220

gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg 14280

ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg 14340

caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt 14400

cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct 14460

cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 14520

cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 14580

agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 14640

tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 14700

agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 14760

atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 14820

ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt 14880

cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 14940

caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 15000

attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 15060

agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctaaattgt 15120

aagcgttaat attttgttaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa 15180

ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 15240

gagtgttgtt ccagtttgga acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa 15300

agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag 15360

ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt 15420

tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg 15480

agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc 15540

cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgtc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 15600

ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc 15660

tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac 15720

ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gg 15752

<210> 5
<211> 4015
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 5

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr

225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys

500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys

770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr
885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu

1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys
1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg

1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu
1400 1405 1410

Phe Asp Lys Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser
1415 1420 1425

Pro Ile Leu Gly Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr
1430 1435 1440

Gly Asp Trp Lys Arg Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr
1445 1450 1455

Ser Ala Asp Lys Asn Ser His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val
1460 1465 1470

Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly
1475 1480 1485

Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg
1490 1495 1500

Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Glu Glu
1505 1510 1515

Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Asp
1520 1525 1530

Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr
1535 1540 1545

Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr Val Thr Pro

1550 1555 1560

His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile Asp Pro
1565 1570 1575

His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr Val
1580 1585 1590

His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
1595 1600 1605

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp
1610 1615 1620

Ser Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg
1625 1630 1635

Ser Asn Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met
1640 1645 1650

Pro Phe Cys Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp
1655 1660 1665

Phe Gln Ile Met Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu
1670 1675 1680

Pro His Ile Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro
1685 1690 1695

Gly Glu His Ala Thr Asp Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg
1700 1705 1710

Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu
1715 1720 1725

Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro
1730 1735 1740

Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe Thr Ile Ile Asn Gly Ser
1745 1750 1755

Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser
1760 1765 1770

Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala Gly Thr Arg Ile
1775 1780 1785

Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly Glu Val Glu
1790 1795 1800

Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr Lys Phe

1805 1810 1815

Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile Lys
1820 1825 1830

Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
1835 1840 1845

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr
1850 1855 1860

Tyr Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu
1865 1870 1875

Gly Trp Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Ala
1880 1885 1890

Val Ile Ile Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Arg Met Glu
1895 1900 1905

Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu Phe Asn Asp Phe Asn Glu Asp
1910 1915 1920

Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr
1925 1930 1935

Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser
1940 1945 1950

Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile
1955 1960 1965

Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn Trp Asp Gly Val Leu Glu Met
1970 1975 1980

Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro Ile Pro Thr Ser Gln Met His
1985 1990 1995

Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met Ser Asp Asn His Asp Ala Ser
2000 2005 2010

Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile
2015 2020 2025

Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys
2030 2035 2040

Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys
2045 2050 2055

Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys Phe Leu Asp Leu His Lys Leu

2060 2065 2070

Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu
2075 2080 2085

Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val Arg Arg Ser Ser His Gly Thr
2090 2095 2100

Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile
2105 2110 2115

Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp
2120 2125 2130

Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys Asp Val Ile Ile Gly Arg Met
2135 2140 2145

Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser
2150 2155 2160

Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp
2165 2170 2175

Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys
2180 2185 2190

Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg
2195 2200 2205

Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln Phe Pro His Phe Glu Asn His
2210 2215 2220

Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile
2225 2230 2235

Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met Ser Val Lys Thr Val Asp Leu
2240 2245 2250

Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe
2255 2260 2265

Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu Lys Leu His Ser Gln Val Thr
2270 2275 2280

Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser
2285 2290 2295

Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe Gln Gln Phe Asn Asp His Lys
2300 2305 2310

Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu Leu Pro His Asp His Pro Phe

2315 2320 2325

Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val
2330 2335 2340

Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys
2345 2350 2355

Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp
2360 2365 2370

Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Lys His Val Arg
2375 2380 2385

Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr
2390 2395 2400

Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu
2405 2410 2415

Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu
2420 2425 2430

Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser
2435 2440 2445

Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr
2450 2455 2460

Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro Met Phe Lys Gly Leu Thr Met
2465 2470 2475

Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser
2480 2485 2490

Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn
2495 2500 2505

His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Leu Ser
2510 2515 2520

Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro
2525 2530 2535

Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile
2540 2545 2550

Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu Met Arg Val His Asn Asn Thr
2555 2560 2565

Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu

2570 2575 2580

Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn
2585 2590 2595

Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val
2600 2605 2610

Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr
2615 2620 2625

Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu
2630 2635 2640

Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys
2645 2650 2655

Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr
2660 2665 2670

Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe
2675 2680 2685

Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val
2690 2695 2700

Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met
2705 2710 2715

Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Glu
2720 2725 2730

Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe
2735 2740 2745

Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser
2750 2755 2760

Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile Pro Gly Leu His Ser Ser Thr
2765 2770 2775

Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val
2780 2785 2790

Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp
2795 2800 2805

Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe Trp Arg Phe Ile His Val His
2810 2815 2820

Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu Met Ser Ala Val Phe Gly Asn

2825 2830 2835

Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile Thr His Ile Asp Lys Leu Val
2840 2845 2850

Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ala Met Gly Met Ser Pro Ala
2855 2860 2865

Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg
2870 2875 2880

Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu
2885 2890 2895

Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn
2900 2905 2910

Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe
2915 2920 2925

Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg
2930 2935 2940

Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp
2945 2950 2955

Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val Ser Ser Leu Thr His Leu Gly
2960 2965 2970

Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser
2975 2980 2985

Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr
2990 2995 3000

Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro
3005 3010 3015

Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly
3020 3025 3030

Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys Pro Asp Gly Ile His Asp Val
3035 3040 3045

Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr
3050 3055 3060

Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys
3065 3070 3075

Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser

3080 3085 3090

Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser
3095 3100 3105

Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu Glu Trp Thr Lys Arg Gln His
3110 3115 3120

Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser
3125 3130 3135

Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu
3140 3145 3150

Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp
3155 3160 3165

Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln
3170 3175 3180

Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr
3185 3190 3195

Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu
3200 3205 3210

Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val
3215 3220 3225

Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly
3230 3235 3240

Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn
3245 3250 3255

Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly
3260 3265 3270

Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Thr His Ala Glu
3275 3280 3285

Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly
3290 3295 3300

Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser
3305 3310 3315

Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Leu Ala His Leu Lys Arg
3320 3325 3330

Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys

3335 3340 3345

Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro
3350 3355 3360

Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile Pro His Lys Ile Pro Thr Ser
3365 3370 3375

Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr
3380 3385 3390

Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser
3395 3400 3405

His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp
3410 3415 3420

Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu
3425 3430 3435

Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu
3440 3445 3450

Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu
3455 3460 3465

Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro
3470 3475 3480

Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn
3485 3490 3495

Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly
3500 3505 3510

Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro
3515 3520 3525

Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser
3530 3535 3540

Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile
3545 3550 3555

Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu
3560 3565 3570

Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg
3575 3580 3585

Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu

3590 3595 3600

Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala
3605 3610 3615

Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu
3620 3625 3630

Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp
3635 3640 3645

Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp
3650 3655 3660

Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu
3665 3670 3675

Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn Tyr Val His Arg Ile Leu Asp
3680 3685 3690

Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys
3695 3700 3705

Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys
3710 3715 3720

Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser
3725 3730 3735

Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu
3740 3745 3750

Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu
3755 3760 3765

Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys
3770 3775 3780

Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile
3785 3790 3795

Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly
3800 3805 3810

Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp
3815 3820 3825

Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile
3830 3835 3840

Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro

3845 3850 3855

Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala
3860 3865 3870

Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile
3875 3880 3885

Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro
3890 3895 3900

Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys
3905 3910 3915

Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser
3920 3925 3930

Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu
3935 3940 3945

Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe
3950 3955 3960

Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp Asn His Leu Lys Trp Ser Asn
3965 3970 3975

Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile
3980 3985 3990

Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu Met Leu Lys Ser Asp Leu His
3995 4000 4005

Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
4010 4015

<210> 6
<211> 4015
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 6

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

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

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Gly Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ser Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
450 455 460

Ser Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Ser Arg Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu
515 520 525

Ala Gln Arg Ala Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly
530 535 540

Val Glu Glu His Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser
545 550 555 560

Asp Thr Glu Ser Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala
565 570 575

Pro Asp Pro Glu Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu
580 585 590

Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp
595 600 605

Lys Gln Pro Glu Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser
625 630 635 640

Thr Ile Lys Ala Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu
645 650 655

Cys Thr Phe Glu Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln
660 665 670

Ile Thr Pro Asp Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro
675 680 685

Ser Gln Ser Glu Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser
690 695 700

Met Thr Phe Gln Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser
705 710 715 720

Leu Asp Glu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly
725 730 735

Asp Gly Arg Met Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr
740 745 750

Lys Lys Leu Tyr Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu Met Ser Ser
755 760 765

Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys Ser Lys Lys
770 775 780

Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser Met Glu Tyr
785 790 795 800

Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val Asp Glu Met
805 810 815

Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe Phe Phe Thr
820 825 830

Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr Tyr Ser Asp
835 840 845

Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile Gly Met Ala
850 855 860

Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ser Ser Asn
865 870 875 880

Leu Lys Ala Asn Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln Pro Glu Tyr
885 890 895

His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Thr His Arg Met Gly Lys
900 905 910

Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg Pro Phe Asn
915 920 925

Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr Ile Tyr Asp
930 935 940

Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His Phe Asn Ser
945 950 955 960

Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe Gly Leu Ile
965 970 975

Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser Ile Gly His
980 985 990

Phe Lys Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Val
995 1000 1005

Val Pro Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala
1010 1015 1020

Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr
1025 1030 1035

Thr Lys Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1040 1045 1050

Lys Ser Gly Asn Val Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr
1055 1060 1065

Gly Ala Leu Lys Asp Ile Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser
1070 1075 1080

Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile
1085 1090 1095

Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp
1100 1105 1110

Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser Ala Asp Asp Lys Trp Leu
1115 1120 1125

Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val Gly Arg Thr Gln Met
1130 1135 1140

Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu Thr Asn Gln Cys
1145 1150 1155

Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro Glu Gly Arg
1160 1165 1170

Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr Lys Ile
1175 1180 1185

Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His Glu
1190 1195 1200

Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly
1220 1225 1230

Met Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val
1235 1240 1245

Ala Asp Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp
1250 1255 1260

Lys Ala Asp Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser
1265 1270 1275

Ser Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe
1280 1285 1290

Trp Gly Gln Leu Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg
1295 1300 1305

Asn Ala Arg Gln Pro Asp Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr
1310 1315 1320

Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu
1325 1330 1335

Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala Pro Pro Gln Gly Arg Asp
1355 1360 1365

Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp Gln Asn Arg Lys Pro
1370 1375 1380

Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala Val Met Ser Leu
1385 1390 1395

Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala Lys Ser Glu
1400 1405 1410

Phe Asp Lys Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser
1415 1420 1425

Pro Ile Leu Gly Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr
1430 1435 1440

Gly Asp Trp Lys Arg Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr
1445 1450 1455

Ser Ala Asp Lys Asn Ser His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val
1460 1465 1470

Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly
1475 1480 1485

Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg
1490 1495 1500

Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Glu Glu
1505 1510 1515

Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Asp
1520 1525 1530

Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr
1535 1540 1545

Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr Val Thr Pro
1550 1555 1560

His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile Asp Pro
1565 1570 1575

His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr Val
1580 1585 1590

His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
1595 1600 1605

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp
1610 1615 1620

Ser Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg
1625 1630 1635

Ser Asn Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met
1640 1645 1650

Pro Phe Cys Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp
1655 1660 1665

Phe Gln Ile Met Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu
1670 1675 1680

Pro His Ile Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro
1685 1690 1695

Gly Glu His Ala Thr Asp Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg
1700 1705 1710

Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu
1715 1720 1725

Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro
1730 1735 1740

Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe Thr Ile Ile Asn Gly Ser
1745 1750 1755

Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser
1760 1765 1770

Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala Gly Thr Arg Ile
1775 1780 1785

Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly Glu Val Glu
1790 1795 1800

Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr Lys Phe
1805 1810 1815

Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile Lys
1820 1825 1830

Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
1835 1840 1845

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr
1850 1855 1860

Tyr Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu
1865 1870 1875

Gly Trp Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Val
1880 1885 1890

Val Ile Ile Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Arg Met Glu
1895 1900 1905

Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu Phe Asn Asp Phe Asn Glu Asp
1910 1915 1920

Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr
1925 1930 1935

Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser
1940 1945 1950

Asp Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile
1955 1960 1965

Pro Ser Met Trp Asp Ser Lys Asn Trp Asp Gly Val Leu Glu Met
1970 1975 1980

Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Pro Ile Pro Thr Ser Gln Met His
1985 1990 1995

Lys Trp Met Gly Ser Trp Leu Met Ser Asp Asn His Asp Ala Ser
2000 2005 2010

Gln Gly Tyr Ser Phe Leu His Glu Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile
2015 2020 2025

Thr Phe Asp Val Val Glu Thr Phe Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys
2030 2035 2040

Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys Glu Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys
2045 2050 2055

Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys Phe Leu Asp Leu His Lys Leu
2060 2065 2070

Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser Glu Val Glu Leu Leu Asn Leu
2075 2080 2085

Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val Arg Arg Ser Ser His Gly Thr
2090 2095 2100

Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro Ser Leu Gly Pro Thr Phe Ile
2105 2110 2115

Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Glu Lys Leu Asp Ile Leu Met Asp
2120 2125 2130

Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys Asp Val Ile Ile Gly Arg Met
2135 2140 2145

Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys Arg Ile Asp Asn Leu Phe Ser
2150 2155 2160

Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp
2165 2170 2175

Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys
2180 2185 2190

Met Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg
2195 2200 2205

Glu Ser Arg Pro Leu Val Pro Gln Phe Pro His Phe Glu Asn His
2210 2215 2220

Ile Lys Thr Ser Val Asp Glu Gly Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile
2225 2230 2235

Arg Phe Leu His Asp Gln Ile Met Ser Val Lys Thr Val Asp Leu
2240 2245 2250

Thr Leu Val Ile Tyr Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe
2255 2260 2265

Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly Leu Glu Lys Leu His Ser Gln Val Thr
2270 2275 2280

Met Lys Lys Asp Ile Asp Val Ser Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser
2285 2290 2295

Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe Gln Gln Phe Asn Asp His Lys
2300 2305 2310

Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu Leu Pro His Asp His Pro Phe
2315 2320 2325

Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr Trp Pro Thr Ala Ala Gln Val
2330 2335 2340

Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His Glu Leu Pro Leu Ile Lys Cys
2345 2350 2355

Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp Pro Ser Ile Ile Tyr Ser Asp
2360 2365 2370

Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Lys His Val Arg
2375 2380 2385

Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln Thr
2390 2395 2400

Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu
2405 2410 2415

Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu
2420 2425 2430

Lys Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser
2435 2440 2445

Leu Met Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr
2450 2455 2460

Leu Ile Lys Thr His Phe Val Pro Met Phe Lys Gly Leu Thr Met
2465 2470 2475

Ala Asp Asp Leu Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser
2480 2485 2490

Ser Gly Gln Gly Leu Lys Ser Tyr Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn
2495 2500 2505

His Ile Asp Tyr Glu Lys Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Leu Ser
2510 2515 2520

Asn Gly Pro Val Phe Arg Val Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro
2525 2530 2535

Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile
2540 2545 2550

Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu Met Arg Val His Asn Asn Thr
2555 2560 2565

Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg Val Cys Trp Gln Gly Gln Glu
2570 2575 2580

Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp Ser Ile Leu Asn
2585 2590 2595

Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn Thr Ala Val
2600 2605 2610

Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr Gln Tyr
2615 2620 2625

Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val Val Glu Leu Gln Gly Ala Leu
2630 2635 2640

Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys
2645 2650 2655

Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr
2660 2665 2670

Met Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe
2675 2680 2685

Arg Gly Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val
2690 2695 2700

Thr Cys Val Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met
2705 2710 2715

Ser Ser Val Ser Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Glu
2720 2725 2730

Asn Pro Ile Asn Ala Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe
2735 2740 2745

Ala Arg Leu Leu Leu Met Met His Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser
2750 2755 2760

Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys Ile Pro Gly Leu His Ser Ser Thr
2765 2770 2775

Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val
2780 2785 2790

Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe Leu Ile Arg Ala Phe Pro Asp
2795 2800 2805

Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe Trp Arg Phe Ile His Val His
2810 2815 2820

Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu Met Ser Ala Val Phe Gly Asn
2825 2830 2835

Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile Thr His Ile Asp Lys Leu Val
2840 2845 2850

Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ala Met Gly Met Ser Pro Ala
2855 2860 2865

Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Ile Glu Ser Arg
2870 2875 2880

Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu
2885 2890 2895

Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn
2900 2905 2910

Pro Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe
2915 2920 2925

Leu Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg
2930 2935 2940

Thr Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp
2945 2950 2955

Asp Leu Ile Val Arg Ser Glu Val Ser Ser Leu Thr His Leu Gly
2960 2965 2970

Lys Leu His Leu Arg Arg Gly Ser Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser
2975 2980 2985

Ala Thr His Ala Asp Thr Leu Arg Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr
2990 2995 3000

Val Ile Gly Thr Thr Val Pro His Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro
3005 3010 3015

Gln His Arg Lys Glu Thr Pro Cys Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly
3020 3025 3030

Phe Asn Tyr Val Ser Val His Cys Pro Asp Gly Ile His Asp Val
3035 3040 3045

Phe Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr
3050 3055 3060

Ser Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys
3065 3070 3075

Val Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser
3080 3085 3090

Trp Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser
3095 3100 3105

Asn Ile His Ser Leu Thr Gly Glu Glu Trp Thr Lys Arg Gln His
3110 3115 3120

Gly Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser
3125 3130 3135

Arg Met Ser His Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu
3140 3145 3150

Thr Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp
3155 3160 3165

Gln Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln
3170 3175 3180

Ile Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr
3185 3190 3195

Asp His Tyr His Ile Ala Cys Lys Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu
3200 3205 3210

Glu Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val
3215 3220 3225

Ser His Val Leu Lys Thr Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly
3230 3235 3240

Gln Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn
3245 3250 3255

Leu Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly
3260 3265 3270

Phe Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Thr His Ala Glu
3275 3280 3285

Asp Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly
3290 3295 3300

Arg Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser
3305 3310 3315

Cys Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Leu Ala His Leu Lys Arg
3320 3325 3330

Pro Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys
3335 3340 3345

Leu Ser Val Ser Pro Pro Phe Ile Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro
3350 3355 3360

Ile Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile Pro His Lys Ile Pro Thr Ser
3365 3370 3375

Tyr Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr
3380 3385 3390

Phe Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser
3395 3400 3405

His Tyr Ser Gln Leu Trp Leu Phe Ser Asp Val Leu Ser Ile Asp
3410 3415 3420

Phe Ile Gly Pro Phe Ser Ile Ser Thr Thr Leu Leu Gln Ile Leu
3425 3430 3435

Tyr Lys Pro Phe Leu Ser Gly Lys Asp Lys Asn Glu Leu Arg Glu
3440 3445 3450

Leu Ala Asn Leu Ser Ser Leu Leu Arg Ser Gly Glu Gly Trp Glu
3455 3460 3465

Asp Ile His Val Lys Phe Phe Thr Lys Asp Ile Leu Leu Cys Pro
3470 3475 3480

Glu Glu Ile Arg His Ala Cys Lys Phe Gly Ile Ala Lys Asp Asn
3485 3490 3495

Asn Lys Asp Met Ser Tyr Pro Pro Trp Gly Arg Glu Ser Arg Gly
3500 3505 3510

Thr Ile Thr Thr Ile Pro Val Tyr Tyr Thr Thr Thr Pro Tyr Pro
3515 3520 3525

Lys Met Leu Glu Met Pro Pro Arg Ile Gln Asn Pro Leu Leu Ser
3530 3535 3540

Gly Ile Arg Leu Gly Gln Leu Pro Thr Gly Ala His Tyr Lys Ile
3545 3550 3555

Arg Ser Ile Leu His Gly Met Gly Ile His Tyr Arg Asp Phe Leu
3560 3565 3570

Ser Cys Gly Asp Gly Ser Gly Gly Met Thr Ala Ala Leu Leu Arg
3575 3580 3585

Glu Asn Val His Ser Arg Gly Ile Phe Asn Ser Leu Leu Glu Leu
3590 3595 3600

Ser Gly Ser Val Met Arg Gly Ala Ser Pro Glu Pro Pro Ser Ala
3605 3610 3615

Leu Glu Thr Leu Gly Gly Asp Lys Ser Arg Cys Val Asn Gly Glu
3620 3625 3630

Thr Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp
3635 3640 3645

Asp Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp
3650 3655 3660

Leu Ile Val Met Asp Met Glu Val Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu
3665 3670 3675

Lys Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn Tyr Val His Arg Ile Leu Asp
3680 3685 3690

Glu Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys
3695 3700 3705

Glu Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys
3710 3715 3720

Thr Val Asp Leu Val Gln Thr Glu Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser
3725 3730 3735

Glu Val Tyr Met Val Cys Lys Gly Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu
3740 3745 3750

Pro Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu
3755 3760 3765

Tyr Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys
3770 3775 3780

Val Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile
3785 3790 3795

Pro Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly
3800 3805 3810

Val Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp
3815 3820 3825

Arg Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile
3830 3835 3840

Ile Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro
3845 3850 3855

Pro Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala
3860 3865 3870

Ile Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile
3875 3880 3885

Pro Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro
3890 3895 3900

Ile Arg Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys
3905 3910 3915

Trp Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu Pro Lys Asp Thr Arg Ile Ser
3920 3925 3930

Asp Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu
3935 3940 3945

Sequence Listing

Val Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe
3950 3955 3960

Asn Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp Asn His Leu Lys Trp Ser Asn
3965 3970 3975

Leu Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile
3980 3985 3990

Ser Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu Met Leu Lys Ser Asp Leu His
3995 4000 4005

Glu Glu Asn Ser Trp Arg Asp
4010 4015

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
2 July 2009 (02.07.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/082664 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/205 (2006.01) *C12N 7/08* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/087375

(22) International Filing Date:
18 December 2008 (18.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/015,868 21 December 2007 (21.12.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **WYETH** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **KAYLAN, Narender, Kumar** [US/US]; 232 North Walnut Street, Ridgewood, NJ 07450 (US). **YURGELONIS, Irina** [US/US]; 719 Midwood Road, Ridgewood, NJ 07450 (US). **HENDRY, Roger, Michael** [US/US]; 384 Route 17a, Warwick, NY 10990 (US). **CUTLER, Mark** [US/US]; 104 Natalie Court, Bloomingdale, NJ 07403 (US). **SYVERTSEN, Kristen, Elissa** [US/US]; 12 Tappan Landing Road, Unit 52b, Tarrytown, NY 10291 (US).

(74) Agents: **MALLON, Veronica** et al.; Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) Date of publication of the international search report:
26 November 2009

[Continued on next page]

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED ATTENUATED VESICULAR STOMATITIS VIRUS, COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

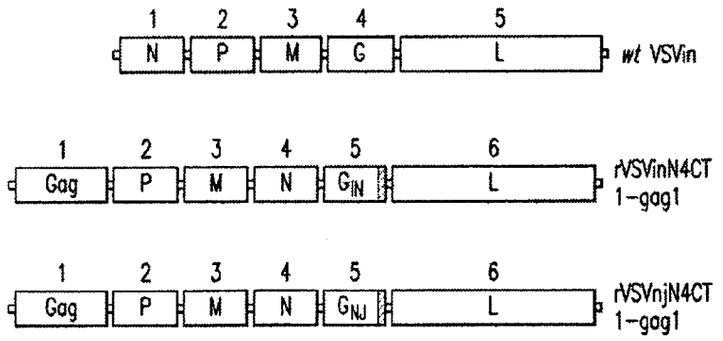


FIG. 1

(57) Abstract: The present invention relates to methods for generating genetically modified and attenuated strains of vesicular stomatitis virus (VSV) for use in the preparation of immunogenic compositions. More particularly, the invention relates to the identification of particular genetic modifications of attenuated VSV that result in an increased yield of virus and an increase in stability of the attenuated strains for preparation of the immunogenic compositions. Methods for cell culture propagation and use in large scale production of VSV is also disclosed.

WO 2009/082664 A3

(15) **Information about Correction:**

Previous Correction:
see Notice of 17 September 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/087375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/205 C12N7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEVIN J M ET AL: "An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 205, no. 2, 15 September 1986 (1986-09-15), pages 303-308, XP025607061 ISSN: 0014-5793 [retrieved on 1986-09-15] the whole document figure 1	1-12, 15-27, 36-39, 43-50
L	WO 01/19380 A (PRO VIRUS INC [US]) 22 March 2001 (2001-03-22) Cited against unity - see figure 21, Mutant 3 page 32, line 7 - line 18	1-12, 15-27, 36-39, 43-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 July 2009	06/10/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sprinks, Matthew

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/087375

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 26 and 27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additional sheet(s)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12,15-27,36-39,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 119 of the M protein.

---

2. claims: 1-12,15-27,36-39,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 142 of the M protein.

---

3. claims: 1-10,13,15-27,36,37,40,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 109 of the G protein.

---

4. claims: 1-10,13,15-27,36,37,40,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 224 of the G protein.

---

5. claims: 1-10,13,15-27,36,37,40,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 438 of the G protein.

---

6. claims: 1-10,13,15-27,36,37,40,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 477 of the G protein.

---

7. claims: 1-10,13,15-27,36,37,40,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 481 of the G protein.

---

8. claims: 1-10,14-27,36,37,41,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 205 of the L protein.

---

9. claims: 1-10,14-27,36,37,41,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 220 of the L protein.

International Application No. PCT/US2008 /087375

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

10. claims: 1-10,14-27,36,37,41,43-50 partially

A VSV comprising an amino acid mutation at position 1450 of the L protein.

---

11. claims: 20-50 partially

A method for adapting any virus for growth in cell culture, including methods starting with, or resulting in VSV comprising mutations.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/087375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0119380 A	22-03-2001	AT 319460 T	15-03-2006
		AT 418341 T	15-01-2009
		AU 782402 B2	28-07-2005
		AU 7588200 A	17-04-2001
		CA 2386920 A1	22-03-2001
		CN 1496268 A	12-05-2004
		DE 60026554 T2	28-09-2006
		EP 1218019 A2	03-07-2002
		ES 2260057 T3	01-11-2006
		ES 2320239 T3	20-05-2009
		HK 1044708 A1	27-10-2006
		HK 1092713 A1	26-06-2009
		JP 2004525855 T	26-08-2004
		MX PA02002772 A	02-04-2004
		NZ 517573 A	27-02-2004
		NZ 523805 A	24-09-2004
		NZ 534306 A	23-12-2005
		NZ 534307 A	29-07-2005

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-074482- -00000-0000
Fecha: 2010-06-21 17:10:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 443

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE** ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

REFERENCIA		
	Radicación No.	10 074482
	Solicitud internacional	PCT/US2008/087375
	Fecha inicio fase nacional	21/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10543

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 AGO. 2010
adpa11

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

REFERENCIA		
	Radicación No.	10 074482
	Solicitud internacional	PCT/US2008/087375
	Fecha inicio fase nacional	21/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10544

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del titulo primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 AGO. 2010
adpa11