



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 239**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/76** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05025974 .6**  
96 Fecha de presentación : **18.09.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1716858**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2006**

54 Título: **Virus oncolítico.**

30 Prioridad: **17.09.1999 US 397873**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.05.2009**

73 Titular/es: **Wellstat Biologics Corporation**  
**930 Clopper Road**  
**Gaithersburg, Maryland 20878, US**

72 Inventor/es: **Bell, John Cameron;**  
**Sonenberg, Nahum;**  
**Stojdl, David Francis;**  
**Brown, Earl Garnet;**  
**Atkins, Harold Lawrence;**  
**Marius, Ricardo Marcellus;**  
**Lichty, Brian Dennis y**  
**Knowles, Shane Brendan**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 320 239 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Virus oncolítico.

5 La presente invención se refiere a un agente terapéutico novedoso contra el cáncer. Más específicamente, esta invención se refiere a virus que infectan selectivamente e inhiben el crecimiento de las células tumorales.

10 Se conoce el uso de bacterias oncolíticas, o composiciones de bacterias oncolíticas, para combatir neoplasmas en seres humanos y animales. Por ejemplo, los documentos EP 564 121, GB 1.587.244 y U.S. 3.192.116 describen el uso de bacterias no patógenas que dan como resultado la liquificación y la lisis de tumores en vertebrados. Sin embargo, en muchos casos, por ejemplo con el uso de Clostridium, los tumores sólo se destruyen parcialmente y todavía puede producirse el crecimiento del nuevo del tumor. Para garantizar el control del crecimiento del tumor, se ha sugerido la administración de bacterias, seguido por fármacos quimioterápicos, por ejemplo 5-fluorodesoxiuridina o agentes alquilantes (por ejemplo, el documento GB 1.069.144).

15 También se ha demostrado que varios virus muestran propiedades tumorocidas, por ejemplo el parvovirus H-1 (Dupressoir *et al.*, 1996. Cancer Res, 49: 3203-3208), el virus de la enfermedad de Newcastle (Reichand *et al.*, 1992. J. Surg. Res, 52: 448-453) o vectores retrovirales que contienen genes de susceptibilidad a fármacos (Takamiya *et al.*, 1993. J. Neurosurg, 79: 104-110). Los documentos W097/26904 y W096/03997 describen un virus herpes simple mutante (VHS-1761) que inhibe el crecimiento de células tumorales. La administración de VHS-1716 que comprende una delección de 759 pares de bases en cada copia de  $\gamma$ 34.5 de la región de repetición larga ( $R_L$ ) a células tumorales elimina estas células. Sin embargo, este virus es específico para células neuronales, ya que se sabe que el VHS habita selectivamente en el sistema neuronal. Además, el uso de patógenos humanos comunes, tal como un virus oncolítico está limitado, ya que es probable que la población general se haya infectado y haya adquirido una respuesta inmunitaria a estos virus. Una respuesta inmunitaria preexistente a una cepa viral similar a la utilizada como agente terapéutico en el tratamiento de un cáncer puede atenuar la eficacia del virus como agente terapéutico.

20 Se ha notificado que otras cepas de virus tienen actividad oncolítica. Se cree que el adenovirus humano ONYX-015 (producido por ONYX pharmaceuticals) se replica preferentemente en células tumorales negativas para p53. Este virus es prometedor en ensayos clínicos con pacientes con cáncer en cabeza y cuello (Kim, D., T. *et al.*, Nat Med, 1998.4: 1341-1342). Oncolytic Biotech está desarrollando el reovirus tipo 3 como agente terapéutico contra el cáncer, que crece preferentemente en células PKR-/- (proteína cinasa dependiente de ARN) (Yin, H. S., J Virol Methods, 1997. 67:93-101; Strong, J. E. y P. W. Lee., J Virol, 1996.70: 612-616; Strong, J. E., *et al.*, Virology, 1993. 197:405-411; Minuk, G. Y., *et al.*, J Hepatol, 1987. 5:8-13; Rozee, K. R., *et al.*, Appl Environ Microbiol, 1978. 35:297-300). Los reovirus de tipo III mostraron propiedades de replicación aumentadas en células que expresaban el oncogén ras mutante (Coffey, M. C., *et al.*, Science, 1998. 282:1332-1334; Strong, J. E., *et al.*, Embo J, 1998. 17:3351-1362). Mundschau y Faller (Mundschau, L. J. y D. V. Faller, J Biol Chem, 1992. 267:23092-23098) han demostrado que el producto del oncogén ras activaba un inhibidor de la PKR, y esto se asoció a la observación de que el inhibidor químico de la PKR, 2-aminopurina, aumentaba el crecimiento de Reo de tipo III en células normales, lo que implica que PKR es un regulador crítico del crecimiento de los reovirus.

40 El documento WO 99/04026 enseña el uso de VEV (virus de la estomatitis vesicular) como un vector en la terapia génica para la expresión de una amplia variedad de productos, incluyendo anticuerpos, inmunógenos, toxinas, etc. para el tratamiento de una variedad de trastornos de enfermedad.

45 Los interferones son factores circulantes que se enlazan a los receptores de la superficie de la célula activando una cascada de señalización que conduce en última instancia a una cantidad de respuestas biológicas. Dos de las consecuencias de la señalización del interferón están estrechamente relacionadas con: (1) una respuesta antiviral y (2) la inducción de señales apoptóticas y/o inhibitoras del crecimiento.

50 La patente estadounidense No. 4.806.347 describe el uso del interferón  $\gamma$  y de un fragmento de IFN- $\gamma$  (conocido como  $\Delta 4\alpha 2$ ) contra células tumorales humanas.

55 El documento WO 99/18799 informa acerca de la actividad citotóxica del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y del virus Sindbis hacia varias células cancerígenas humanas. Sin embargo, ambos virus demostraron selectividad en su actividad citotóxica hacia las células tumorales.

60 El documento WO 99/18799 describe que la adición del interferón a células normales hace que estas células sean resistentes al NDV, aunque este efecto no se observó con células tumorales tratadas con interferón que continuaban mostrando sensibilidad inducida por NDV. El documento WO 99/18799 también describe la actividad citotóxica de las células VEV frente a las células KB (carcinoma de cabeza y cuello) y HT 1080 (fibrosarcoma), y el alivio de la citotoxicidad en células normales y tumorales, mediante VEV, en presencia del interferón. No se probaron otros tipos celulares frente a la actividad citotóxica de VEV.

65 Se ha informado acerca de ciertas cepas mutantes de VEV. Stanners, *et al.*, Virology (1987) 160(1): 255-8. Francoeur, *et al.*, Virology (1987) 160(1): 236-45. Stanners, *et al.*, J. Gen. Virol. (1975) 29 (3): 281-96. Stanners, *et al.*, Cell (1977) 11 (2): 273-81.

## ES 2 320 239 T3

WO 99/64068 describe virus atenuados de hebra negativa con actividad antagonista alterada del interferón para uso como vacunas y compuestos farmacéuticos.

WO 93/18790 describe una vacuna que contiene virus vivos, para terapia de enfermedades virales y neoplasias.

La presente invención estipula el uso de un virus para la fabricación de un medicamento para reducir la viabilidad de una célula tumoral en un individuo mamífero, en donde el virus es una cepa atenuada del virus de la estomatitis vesicular, en donde el virus está contenido en una célula infectada con el virus, y en donde la célula tumoral es un carcinoma.

En una modalidad, la célula tumoral es un carcinoma de próstata o un carcinoma de ovario.

En una modalidad, se selecciona el virus entre la cepa M1 del virus de la estomatitis vesicular, la cepa M2 del virus de la estomatitis vesicular, la cepa M3 del virus de la estomatitis vesicular, la cepa M4 del virus de la estomatitis vesicular, la cepa M5 del virus de la estomatitis vesicular.

En una modalidad, la célula tumoral es una célula cancerosa hematopoyética, un melanoma, un sarcoma, un tumor neuroendocrino, un carcinoma de pulmón o un carcinoma de colon.

En una modalidad, el individuo mamífero es un mamífero humano o no humano.

En una modalidad, la línea celular infectada con virus es para administración a un individuo por medio de una ruta seleccionada entre intratumoral, intravenosa o intraperitoneal.

En una modalidad, el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen N que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína N que la secuencia de ADNc del gen N para las cepas M2, M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 14.

En una modalidad, el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen P que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína P que la secuencia de ADNc del gen P para las cepas M2, M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 16.

En una modalidad, el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen M que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína M que la secuencia de ADNc del gen M para las cepas M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 18.

En una modalidad, el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen G que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína G que la secuencia de ADNc del gen G para las cepas M2, M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 20.

En una modalidad, el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen L que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína L que la secuencia de ADNc del gen L para las cepas M2 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 22.

La presente solicitud describe una nueva terapia contra el cáncer. Más específicamente, esta invención se relaciona con el uso de virus que infectan selectivamente e inhiben el crecimiento de una célula tumoral, como se define en las reivindicaciones.

Esta solicitud también describe un uso en donde la población de células es tratada con interferón antes de administrar el virus.

La solicitud describe un método para identificar un tumor susceptible de ser tratado con un virus, que comprende: (a) dividir una muestra que contiene células del tumor en una primera porción y en una segunda porción; (b) tratar la primera porción con el virus; y (c) determinar si el porcentaje de células muertas en la primera porción es superior que aquella en la segunda porción, en donde el tumor es susceptible de tratamiento con el virus si el porcentaje de células muertas en la primera porción es superior que aquella en la segunda porción.

Esta solicitud describe un método para identificar un tumor susceptible de ser tratado con un virus, que comprende: (a) dividir una muestra que contiene células del tumor en una primera porción y en una segunda porción; (b) tratar la primera porción con el virus y una cantidad de interferón suficiente para mejorar la supervivencia de las células que responden al interferón en presencia del virus, y tratar la segunda porción con el virus en ausencia de interferón; y (c) determinar si el porcentaje de células muertas en la primera porción es superior que aquella en la segunda porción, en donde el tumor es susceptible de tratamiento con el virus si el porcentaje de células muertas en la primera porción es superior que aquella en la segunda porción.

La solicitud describe un mutante VEV, caracterizado porque el mutante VEV se desarrolla pobremente en células que responden al interferón. Tales cepas son también denominadas aquí como cepas atenuadas de VEV, o cepas de VEV que se desarrollan pobremente en células que responden al interferón. Se las puede identificar por su producción

de placas más pequeñas en monocapas de células que responden al interferón que en células que no responden al interferón, como se describe más adelante. Las cepas atenuadas de VEV pueden ser identificadas también por tener un LD50 superior cuando se las administra en forma intranasal a ratones PKR+/- comparadas con WT Indiana, en el ensayo descrito más adelante.

La solicitud también describe un método para aislar VEV utilizando una matriz de afinidad, que comprende la adición de la VEV a la matriz de afinidad para producir VEV enlazada, lavando la VEV enlazada, y eluyendo la VEV de la matriz de afinidad. También se describe en la presente solicitud una VEV modificada que comprende una proteína de fusión no nativa sobre la superficie exterior del virus. La proteína no nativa puede ser una proteína de fusión que contiene una etiqueta de afinidad y una proteína viral envolvente, o se la puede derivar de una célula productora.

La presente solicitud también describe moléculas aisladas de ácido nucleico (ADN o ARN) que tienen una secuencia que codifica para proteínas del VEV mutante y secuencias complementarias a la misma. Tales moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse en la preparación de un VEV recombinante o como vacuna de ADN.

Hay varias ventajas para el uso de un virus tal como se describe en el presente documento como virus terapéutico en relación con otros virus:

- Los rabdovirus no son patógenos humanos comunes. Por ejemplo, el VEV se encuentra principalmente en insectos, roedores y animales de granja domésticos y, por tanto, una gran proporción de individuos no se habrán infectado o inmunizado frente a la infección por VEV. Por otra parte, los adenovirus o los reovirus son patógenos humanos y la mayor parte de la población general se ha infectado y ha adquirido una respuesta inmunitaria frente a ambos virus. Una respuesta inmunitaria preexistente a una cepa viral similar a la utilizada como agente terapéutico en el tratamiento de un cáncer puede atenuar la eficacia del virus como agente terapéutico;
- El VEV se replica mucho más rápidamente que los adenovirus o los reovirus, y puede concentrarse fácilmente hasta títulos altos. La producción de preparaciones de virus de título alto es una limitación significativa de otras posibles cepas virales terapéuticas;
- El VEV es un virus simple que comprende sólo cinco genes, fácilmente tratable mediante manipulación genética. Tal sistema no está actualmente disponible para reovirus;
- La infección celular mediante VEV responde enormemente a los agentes químicos adicionales tales como el interferón, una característica que potencia su valor terapéutico;
- El VEV tiene un amplio intervalo de huéspedes y puede infectar a la mayoría de los tipos de células humanas, mientras que otros virus son más limitados en cuanto a los tipos de células que puede infectar;
- El VEV es un virus ARN y la totalidad de su ciclo de vida transcurre en el citoplasma. Por tanto, supone menos peligro de integración no deseada en el genoma de un paciente.

Colectivamente, estos atributos del VEV proporcionan ventajas significativas sobre el uso de los otros virus que se sabe que muestran actividad oncolítica.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características necesarias de la invención sino que la invención puede residir también en una subcombinación de las características descritas.

## Breve descripción de los dibujos

Éstas y otras características de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra una representación esquemática general de la cascada del interferón.

La figura 2 muestra el efecto del VEV sobre fibroblastos humanos normales, la línea celular de melanoma humano SK-MEL3, LNCaP, una línea celular de cáncer de próstata y la célula de carcinoma de ovario A2780, en presencia y ausencia de interferón tal como se determina mediante un ensayo de cpe (efecto citopático) modificado. Se infectaron monocapas de células en una MOI (multiplicidad de infección) de 0,1 ufp (unidades formadoras de placa) en una placa de 12 pocillos. A tiempo 0 y cada 12 horas posteriormente hasta las 48 horas, un pocillo de células infectadas se fijó con 0,5 ml de fijación Leukostat durante 2 minutos. Al final del experimento, las monocapas se tiñeron con tinciones de Leukostat.

La figura 3 muestra el efecto citopático del VEV en células de fibroblastos normales (figura 3 (a)), y líneas celulares de tumor, incluyendo células tumorales de ovario (figura 3 (b)) y células tumorales KB (figura 3 (c)).

La figura 4 muestra el efecto del VEV sobre fibroblastos humanos normales co-cultivados con células tumorales 293T durante un periodo de 24 horas. Los co-cultivos se infectaron a una MOI de 0,1 ufp/célula y se permitió que la infección continuara en presencia (IFN+) o ausencia (IFN-) de interferón. Los cultivos se tiñeron con anticuerpos frente al antígeno T grande (núcleos rojos) para detectar las células 293T y con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) (núcleos azules) que tiñen todos los tipos de células.

La figura 5 muestra el efecto del VEV *in vivo* sobre tumores implantados dentro de ratones desnudos. Se implantaron células de melanoma humano dentro de ratones desnudos y, o bien se les inyectó una simulación (VEV (-)), se les inyectó el VEV de tipo natural (datos no presentados), o se les inyectaron células de melanoma adicionales infectadas *in vitro* con VEV durante una hora antes de la inyección en el sitio del tumor de VEV (+)). El tamaño de los tumores se determinó durante un periodo de 7 días.

La figura 6 muestra las úlceras formadas sobre un tumor producidas dentro de un ratón desnudo, tal como se describe en la figura 5.

Figura 7: VEV y células infectadas con VEV inhiben el crecimiento de xenoinjertos de melanoma humano en ratones desnudos.

Figuras 8A y 8B: Los ratones PKR-/- son extremadamente sensibles a la infección intranasal por VEV y demuestran una deficiencia en la resistencia mediada por el IFN.

Figura 9: El interferón puede proteger a ratones desnudos que llevan un xenoinjerto durante el tratamiento con VEV.

Figuras 10A y 10B: Producción de virus a partir de células tumorales y células normales infectadas con la cepas de VEV natural de tipo Indiana y varias cepas de VEV mutantes.

Figura 11: Las células malignas se eliminan rápidamente tras la infección por VEV (WT Indiana (tipo natural Indiana)) y no están protegidas mediante el IFN- $\alpha$ .

Figura 12: VEV indujo un efecto citopático visible en células de melanoma humano pero no en células humanas primarias o sin IFN- $\alpha$ .

Figura 13: Eficacia de una dosis intravenosa única del VEV mutante en el tratamiento de xenoinjertos de melanoma humano en ratones desnudos.

Figura 14: Secuencia de ADNc de la proteína N de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 15: Secuencia de aminoácidos de la proteína N de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 16: Secuencia de ADNc de la proteína P de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 17: Secuencia de aminoácidos de la proteína P de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 18: Secuencia de ADNc de la proteína M de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 19: Secuencia de aminoácidos de la proteína M de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 20: Secuencia de ADNc de la proteína G de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 21: Secuencia de aminoácidos de la proteína G de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 22: Secuencia de ADNc de la proteína L de los VEV de tipo natural y mutante.

Figura 23: Secuencia de aminoácidos de la proteína L de los VEV de tipo natural y mutante.

### Descripción de las realizaciones preferidas

La presente solicitud describe un agente terapéutico novedoso contra el cáncer. Más específicamente, esta invención se refiere al uso virus que infectan selectivamente e inhiben el crecimiento de las células tumorales, como se define en las reivindicaciones.

Las células cancerígenas obtienen una ventaja de supervivencia con respecto a sus homólogas normales al adquirir mutaciones en las rutas apoptóticas o de inhibición del crecimiento y, en el caso de los interferones, lo harían así a expensas de mecanismos de defensa antivirales críticos. A medida que las células tumorales obtienen una ventaja de crecimiento significativa mediante la mutación de los genes de respuesta al interferón, serán más susceptibles a la infección viral.

Por “reducción de la viabilidad” de una célula tumoral se quiere decir o bien la muerte de la célula tumoral o bien la limitación de su crecimiento durante un periodo de tiempo.

Por “no es un patógeno humano común” se quiere decir un virus que se encuentra principalmente en huéspedes no humanos, por ejemplo, pero sin limitarse a insectos, roedores y animales de granja. Tales virus no se encuentran normalmente dentro de la población humana general.

Tal como se usa en el presente documento Mutante I, Mutante 1, Mut 1 y MI se refieren a la cepa T1026 mutante atenuada. Mutantes II, III, IV y V (y la nomenclatura variante análoga a Mutante I) se refieren a los mutantes T1026R, TP3, TP6 y G31 atenuados, respectivamente.

El agente terapéutico novedoso contra el cáncer para uso en la presente invención incorpora una cepa atenuada del virus de la estomatitis vesicular (VEV) que apunta selectivamente a las células tumorales y conduce a su destrucción. Por un derivado del VEV, se quiere decir un virus VEV obtenido o bien seleccionando el virus bajo diferentes condiciones de crecimiento, o bien uno que se ha sometido a una diversidad de presiones de selección, o bien uno que se ha modificado genéticamente utilizando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. Por ejemplo, lo que no debe considerarse como limitante en modo alguno, un derivado de VEV puede incluir un VEV mutante seleccionado tras la infección en una célula humana que se ha tratado con interferón tal como se describe en el presente documento, o un VEV que muestra una etiqueta de afinidad útil para la purificación por afinidad.

La eficacia de la inhibición por parte del virus oncolítico del crecimiento de la célula tumoral reside en parte en la sensibilidad diferencial de las células tumorales, en comparación con las células normales, a la infección viral. Sin desear adherirse a ninguna teoría, la sensibilidad diferencial puede deberse en parte a la regulación por disminución o a la inactivación de factores dentro de una célula que en caso contrario funcionan para proteger a la célula del crecimiento de tumores y de la infección por virus. Ejemplos de factores que cuando se inactivan dan como resultado el crecimiento de células tumorales, y que también están implicados en mediar la infección por virus, incluyen pero sin limitarse a PKR (cinasa dependiente de ARN de doble cadena) y PML (gen de la leucemia promielocítica), sin embargo, debe entenderse que otros factores también pueden desempeñar un papel.

Se sabe que la regulación por disminución o la inactivación de la PKR, mediante una variedad de mecanismos que incluyen, pero sin limitarse a, los mediadores relacionados con la PKR, están asociadas con el crecimiento de la célula tumoral, mientras que las células normales muestran una PKR activa. Además, las células de tipo natural expuestas a la infección viral muestran una expresión elevada de PKR que da como resultado la supresión de la replicación viral, mientras que las células que muestran actividad de PKR reducida o ausencia de la misma, son sensibles al ataque viral y muestran crecimiento canceroso. De manera similar, el producto génico de PML funciona como un inhibidor tumoral y también se sabe que inhibe la replicación viral.

Por “sensibilidad diferencial” se quiere decir una propiedad asociada con una célula que da como resultado tanto el crecimiento de la célula tumoral como la incapacidad de la célula para inhibir la replicación viral. Las células que muestran sensibilidad diferencial son las candidatas preferidas para el tratamiento del crecimiento de células tumorales utilizando el agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención. Esta sensibilidad diferencial puede acentuarse mediante la adición de uno o más agentes químicos antes de o durante el tratamiento de la célula tumoral. Preferiblemente, este agente químico aumenta la resistencia de una célula de tipo natural a la infección viral, pero tiene poco o ningún efecto sobre la respuesta de una célula tumoral a la infección viral. Un ejemplo, que no debe considerarse limitante en modo alguno, de un agente químico de este tipo es el interferón.

Por “PKR” se quiere decir una serina/treonina cinasa que muestra múltiples funciones, incluyendo papeles en el control de la traducción del ARNm y la transcripción génica (1,2). La cinasa alberga dos motivos de unión al ARN de doble cadena, ARNdc, en su mitad reguladora amino terminal y un dominio cinasa catalítico en su cola carboxílica. La unión del ARNdc al extremo amino induce un cambio conformacional en la enzima que revela y activa el dominio de cinasa catalítico. La expresión de PKR está inducida por varios mediadores de la PKR, incluyendo, pero sin limitarse al interferón.

Por “mediador de la PKR” se quiere decir proteínas o compuestos que afectan directa o indirectamente a la actividad de la PKR a nivel génico o proteico e incluye tanto activadores de la PKR como inhibidores de la PKR. Ejemplos de los activadores de la PKR incluyen, pero no se limitan a, STAT1 (véase la figura 1), el factor regulador del interferón (IRF-1), y el interferón. Ejemplos de inhibidores de la PKR incluyen, pero sin limitarse a, VA RNA, p58 (IPK), factores asociados con la ruta Ras, la proteína ribosómica L18, o proteasas que degradan la proteína PKR. La actividad de la PKR también puede mediar a través de mutaciones en el gen que codifica para la PKR, o en la región reguladora que conduce a la expresión de PKR. Estas mutaciones pueden aumentar o disminuir la actividad de PKR. Las mutaciones en la PKR que reducen la actividad de PKR incluyen, pero sin limitarse a, la pérdida de la capacidad de unión al ARNdc de la PKR, o mutaciones que dan como resultado mutantes catalíticos negativos. Las mutaciones que aumentan la actividad de PKR incluyen, pero no se limitan a, la sobreexpresión de PKR, o mutaciones que dan como resultado una proteína PKR más activa.

PKR regula la traducción mediante la fosforilación de eIF-2 $\alpha$ , un factor que participa en el inicio de la traducción de proteínas. Una vez fosforilado, eIF-2 $\alpha$ -GDP, forma un complejo inactivo con eIF-2B lo que da como resultado una rápida inhibición de la síntesis de proteínas. PKR incide sobre la transcripción génica indirectamente mediante la

activación de NF $\kappa$ B. Esta activación parece llevarse a cabo mediante la fosforilación por la PKR de una I $\kappa$ B cinasa (3) que, a su vez, fosforila a I $\kappa$ B, lo que conduce a su destrucción dirigida.

#### Actividad antiviral de PKR

La infección de una célula por muchos tipos de virus distintos conduce a la formación de ARNdc (por ejemplo, como productos intermedios de la replicación) lo que da como resultado la activación de PKR y de sus efectores posteriores en el sentido de 3' (véase la figura 1). En particular, la síntesis de proteínas se termina rápidamente y se inicia una cascada apoptótica (4,5). Como resultado de la activación de PKR, se reduce la producción de nuevos viriones y se limita la diseminación del virus por el organismo. Der *et al* (12) informan de una necesidad de PKR en la inducción de la apoptosis celular en respuesta a una variedad de agentes inductores del estrés.

Sin adherirse a ninguna teoría, es posible que los cánceres surjan como resultado de múltiples mutaciones en los genes que controlan la proliferación celular y la apoptosis. El papel de la PKR en la regulación de la síntesis de proteínas asociada a sus propiedades antiproliferativas y pro-apoptóticas la convierten en una diana para las mutaciones oncogénicas, lo que afecta directa o indirectamente a su actividad.

Tal como se describe en más detalle en los ejemplos, una selección inicial de varios virus utilizando animales PKR $^{-/-}$  indicó que los animales sin PKR son susceptibles de infección por el virus de la estomatitis vesicular (VEV). Se obtuvieron resultados similares *in vitro*, donde la infección por VEV avanzó más rápidamente en fibroblastos PKR $^{-/-}$ , cuando se comparaba con la infección en fibroblastos PKR  $+/+$ . Estos resultados demuestran que las células de mamíferos requieren la PKR para resistir a las infecciones por VEV. Además, ciertas líneas celulares, por ejemplo, pero sin limitarse a la médula ósea humana primaria, eran resistentes a la infección por VEV, mientras que las líneas celulares de leucemia eran sensibles a la infección por VEV.

Se considera que los virus relacionados con VEV, u otros virus que muestran mecanismos similares de infección viral pueden identificarse como que muestran la propiedad de infectar selectivamente células con actividad PKR reducida o ausencia de la misma. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente otros virus utilizando los métodos tal como se describen en el presente documento, por su capacidad para reducir la viabilidad de las células, o eliminar las células que carecen de actividad PKR, o células PKR $^{-/-}$ , animales PKR  $^{-/-}$ , o tanto células como animales PKR $^{-/-}$ .

Tal como se indica en los ejemplos más adelante, el pretratamiento de las células con interferón reduce la capacidad de infección de los virus en varios órdenes de magnitud. Sin desear adherirse a ninguna teoría, la adición del interferón puede regular por incremento la expresión de PKR dando como resultado este aumento de la resistencia a la infección viral.

Debido a su potente actividad antiviral, los virus han desarrollado estrategias para sortear a la PKR. Por ejemplo, el VIH y el virus de la hepatitis C codifican para proteínas cuya función es unirse y activar la PKR (6,7). Los adenovirus codifican para pequeñas moléculas de ARN (VA RNA) que se unen a, pero que no activan la PKR (8). El virus de la gripe usurpa una proteína celular p58 (IPK) para inhibir la PKR, mientras que el virus de la polio inicia la degradación proteolítica de la PKR (9,10). El antígeno T grande de SV-40 parece funcionar en el sentido de 3' de eIF-2 $\alpha$  para potenciar la traducción de proteínas, incluso en presencia de la PKR activada (10).

#### PKR e inhibición tumoral

La expresión de mutantes catalíticos de PKR dominantes negativos en células NIH 3T3 conduce a su transformación en células cancerígenas y facilita su crecimiento como tumores en modelos de ratón desnudo (13,14). Se ha observado un fenómeno similar utilizando mutantes de PKR que han perdido la actividad de unión a ARNdc. La expresión inducida de PKR en *S. cerevisiae* conduce a la detención del crecimiento en la levadura (un fenómeno que puede revertirse mediante la coexpresión de una versión no fosforilable de eIF-2 $\alpha$ ). Por tanto, PKR tiene actividad anti-proliferativa y funciona como un inhibidor tumoral.

Hay varias líneas de evidencia de que PKR está inactivada, ausente o reducida en su expresión en un amplio espectro de cánceres humanos:

- Las mutaciones de Ras oncogénicas se producen en aproximadamente el 30% de todos los tumores humanos, mientras que las mutaciones en los activadores de Ras en la dirección de 5' (es decir, receptor de EGF, receptor de Neu, receptor de PDGF) son incluso más comunes. Mundschauf y Faller (15,16) han descrito un inhibidor de PKR inducido por Ras oncogénico. Además, Strong *et al* (17) demostraron que la activación de la ruta de Ras da como resultado la regulación por disminución de la actividad de PKR.
- La proteína ribosómica L18 está sobreexpresada en tejidos de cáncer colorrectal primario y recientemente se ha demostrado que se une a e inactiva la PKR (18).
- Los pacientes con translocaciones de 5q muestran una expresión disminuida de PKR (19-21). El factor 1 regulador del interferón (IRF-1) es un factor de la transcripción con actividad de supresión de tumores, que

se mapea en la región cromosómica humana 5q. La transcripción del gen de PKR está regulada en parte por IRF-1.

- La PKR humana mapea en 2p21-22 y recientemente se ha identificado como el sitio de translocación en un caso de leucemia mielógena aguda.
- En biopsias de tumores escasamente diferenciados y altamente malignos, la proteína PKR estaba presente a niveles muy bajos o fue indetectable (23-25).

#### STAT1

STAT1 es un mediador esencial de la ruta del interferón y su activación da como resultado una regulación por incremento del ARNm de PKR y de la proteína (véase la figura 1).

Hay una marcada deficiencia en el nivel/actividad de la proteína STAT1 en las líneas celulares de melanoma resistentes al interferón y en el material de biopsia de melanoma primario (26), en una variedad de líneas de células tumorales humanas incluyendo la leucemia mieloide, los carcinomas cervicales, el cáncer de ovario y un carcinoma de pulmón (27), y en un adenocarcinoma gástrico (28,29). Además, el linfoma cutáneo de células T (LCCT) es un cáncer que, en general, responde al interferón (sin embargo, con frecuencia se produce resistencia clínica en una parte sustancial de los casos). Sun *et al* (30) han informado de que la proteína STAT1 está ausente en una línea celular de LCCT, lo que sugiere que el desarrollo de resistencia clínica al interferón puede surgir debido a mutaciones de STAT1.

#### PML: Gen de la leucemia promielocítica

PML es un gen inducido por el interferón que normalmente funciona como un inhibidor tumoral y un regulador clave de la apoptosis inducida por Fas, TNF $\alpha$  e interferón. Recientemente, Chelbi-Alix *et al* han demostrado que otra función normal del producto génico de PML es inhibir la replicación de los virus. La proteína de fusión PML-RAR funciona como un inhibidor negativo dominante de la apoptosis inducida por el interferón y podría predecirse que también hará que las células APL sean preferentemente sensibles a la infección por virus.

La regulación por disminución de la actividad o la proteína PKR se produce en un amplio espectro de cánceres humanos. Aunque las células cancerígenas logran una ventaja de crecimiento y capacidad de traducción de la proteína sin control mediante la eliminación de la PKR o los mediadores de la PKR, estas células han eliminado simultáneamente uno de los mecanismos de defensa antivirales potentes y primarios de las células. Por tanto, las células tumorales con actividad PKR reducida serán más sensibles a la infección que sus homólogas normales. Tal como se indicó anteriormente, otros componentes (por ejemplo, STAT1 y PML) de la ruta del interferón están mutados frecuentemente en los cánceres humanos, y la pérdida de su actividad dará lugar a células tumorales sensibles a la infección por virus. Esta sensibilidad diferencial constituye la base del uso de agentes terapéuticos contra el cáncer basados en virus de la presente invención para el tratamiento del crecimiento de las células tumorales.

La selección de cepas de ratón sin PKR con varios virus diferentes indicó que los animales sin PKR pueden inhibir varias infecciones virales incluyendo la del virus vaccinia, el virus de la gripe y EMCV (virus de la encefalomiocarditis). Sin embargo, el virus de la estomatitis vesicular (VEV) mostró capacidad para infectar animales PKR *-/-*. Se observó que el VEV, un miembro de la familia de los rhabdovirus, mataba el 100% de los animales sin PKR tras la infección intranasal por tan solo 50 partículas virales infecciosas (o unidades formadoras de placas, ufp). Por el contrario, se requirió un número más de 20.000 veces mayor de partículas de VEV para matar a la mitad de las camadas infectadas por el tipo natural.

El VEV es un virus ARN de sentido negativo, con envuelta, con un genoma simple de cinco genes. Ésta es una familia de virus muy bien caracterizada con varias cepas de laboratorio serológicamente distintas y una multitud de mutantes caracterizados. Los huéspedes naturales del VEV incluyen insectos, roedores y animales de granja domésticos. En general, muy pocos norteamericanos han entrado en contacto con el virus (la mayoría de las infecciones en seres humanos se producen en personal de laboratorio y granjeros). En los seres humanos, las infecciones o bien son asintomáticas o bien se manifiestan como "gripe" leve. No se han notificado casos de enfermedad grave ni muerte entre los seres humanos infectados.

También se observó la capacidad del VEV para infectar selectivamente células tumorales con respecto a las células de tipo natural. Las líneas de células tumorales, tras una infección durante la noche, mostraron una tasa de infección de 100 a 1.000 veces superior que la detectada en fibroblastos primarios normales. Además, se aceleró el efecto citopático (cpe) en los cultivos de células tumorales.

Dado que la PKR es un producto génico inducible por el interferón, se probó el pretratamiento de las células con interferón antes de la exposición a VEV para determinar el efecto de la infección viral. Los cultivos celulares de tipo natural, que estaban pretratados con interferón, fueron resistentes a la infección por VEV, mientras que las líneas celulares tumorales, por ejemplo, pero sin limitarse a, fibrosarcoma, melanoma, carcinoma de próstata, leucemia y sarcoma de ovario, fueron sensibles a la infección viral (véase la tabla 1, ejemplo 2; figura 2). Las células de carcinoma de pulmón (LC80) también fueron susceptibles a la infección por VEV en presencia o ausencia de interferón (datos



no presentados). Sin embargo, varias líneas celulares tumorales fueron resistentes a la infección por VEV en presencia de interferón.

Las células de carcinoma de ovario, fibrosarcoma, carcinoma de pulmón, melanoma, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmón, y leucemia son sensibles al VEV, y esta sensibilidad se mantuvo en presencia del interferón, por lo que tales células tumorales y cánceres derivados de las mismas pueden ser particularmente fáciles de tratar mediante el tratamiento con VEV. Sin embargo, otros cánceres también pueden ser fáciles de tratar con el tratamiento viral tal como se describe en el presente documento. Estudios con respecto a la sensibilidad frente a VEV utilizando material tumoral primario están fácilmente disponibles en fluido de ascitis. Además, dado que el tumor está contenido dentro de la cavidad peritoneal, puede demostrar ser particularmente adecuado para la administración localizada de un agente terapéutico basado en un virus. A este respecto, puede probarse tejido vivo a partir del fluido ascítico del paciente para determinar la capacidad de las células tumorales para soportar la infección por VEV en presencia y ausencia de interferón.

Se espera que el VEV tendrá actividad terapéutica *in vivo*, y tendrá la capacidad de eliminar crecimientos tumorales distantes (metastáticos). Hasta la fecha no se ha observado ninguna patología orgánica significativa en ratones tratados, sin embargo, es necesario estudiar adicionalmente la cinética de la viremia del VEV. Se implantaron células de melanoma humano que recibieron VEV, o células de melanoma adicionales infectadas *in vitro* con VEV, en ratones desnudos (véase el ejemplo 5), para garantizar la producción continua de partículas infectivas en el tumor durante un periodo de varias horas, mediante inyección (figura 5). En animales a los que se inyectó una simulación (VEV(-); inyección con vehículo solo), los tumores crecieron continuamente durante el transcurso del experimento. Los animales que recibieron sólo el virus puro mostraron inicialmente un crecimiento continuo de los tumores durante el primer periodo de cuatro días, tras este tiempo los tumores comenzaron a reducirse en tamaño y continuaron así durante el transcurso de este experimento. Los tumores que se inyectaron con células infectadas dejaron de crecer y experimentaron una regresión hasta pequeños nódulos duros que parecían tejido cicatrizal. En algunos de los tumores inyectados más grandes, se formaron úlceras en el tumor en el plazo de 1 - 2 días (véase la figura 6). Mientras que tanto la inyección de virus purificado como de células de melanoma infectadas produjeron regresiones significativas, las células productoras infectadas fueron más eficaces.

Los estudios con un modelo tumoral de ratón inmunocompetente (es decir, tal como se describe por Strong et al; 17) examinarán los efectos de la respuesta de anticuerpos a la infección terapéutica por VEV y determinarán si la infección por VEV de las células tumorales aumenta su inmunogenicidad y potencia el reconocimiento de antígenos tumorales por el organismo huésped.

También se encontró que la médula ósea humana primaria era resistente a la infección por VEV en ausencia de pretratamiento con interferón (véase la tabla 1, ejemplo 2), lo que indica que estas células tienen una resistencia innata a la infección por VEV. Por el contrario, también se probaron dos líneas celulares de leucemia (M07E y L1210) y se encontró que eran sensibles a infección por VEV tal como se puso de evidencia por el efecto citopático, el crecimiento del virus y la pérdida de viabilidad celular.

Aunque los resultados descritos en el presente documento se refieren a VEV, debe entenderse que un experto en la técnica, siguiendo los métodos explicados en este documento, podrá seleccionar fácilmente otras cepas de VEV, derivados de VEV que incluyen mutantes de VEV, o virus relacionados por su capacidad para eliminar selectivamente células tumorales. Hay otras diversas cepas de VEV serológica y biológicamente distintas, que pueden probarse para determinar esta propiedad. Tales cepas de VEV incluyen, pero no se limitan a New Jersey, Piry, Coccal, y Chandipura. La identificación de otras cepas adecuadas no relacionadas serológicamente puede ser útil si se requieren inyecciones secuenciales de VEV para erradicar completamente los tumores. Además, se sabe que los picornavirus (por ejemplo, los rinovirus) son relativamente inocuos para los tejidos humanos normales aunque crecen extremadamente bien en células transformadas en cultivo de tejido, y también se pueden utilizar estos virus. Además, se pueden utilizar combinaciones de virus para mejorar el efecto citopático observado con VEV.

Con el fin de determinar si la presencia de una célula normal o tumoral podría afectar al otro tipo celular (célula normal y tumoral) y modificar la resistencia o susceptibilidad de cualquiera de estas células a la infección por VEV, se co-cultivaron células normales y fibroblastos en presencia de VEV. El cultivo se infectó a una MOI de 0,1 ufp/célula y se dejó que la infección avanzara en presencia y ausencia de interferón. A las 0, 12 y 24 horas (figura 4), los cultivos se fijaron y se tiñeron con anticuerpos frente al antígeno T grande (núcleos rojos) para detectar las células 293T y con DAPI (núcleos azules) que tiñen todos los tipos de células (figura 4). El número de células 293T (núcleos rojos) disminuyó a ritmo constante durante el transcurso de tiempo y mostró núcleos gravemente condensados o fragmentos característicos de una célula que muere a partir de apoptosis inducida viralmente. Esta destrucción selectiva de las células transformadas se observó tanto en presencia como en ausencia de interferón. Los fibroblastos normales no desarrollaron cambios nucleares ni sus números se redujeron en respuesta a la infección por VEV, aun cuando las células 293T estaban produciendo cantidades abundantes de virus dentro del co-cultivo. Esto indica que las mezclas de poblaciones celulares pueden tratarse con VEV mientras que todavía mantienen la sensibilidad de la célula tumoral y la resistencia de la célula normal al VEV.

Además, hay varios mutantes del VEV, por ejemplo, pero sin limitarse a mutantes que afectan a la paralización de la síntesis de proteínas del huésped o son más o menos sensibles al interferón, que pueden mostrar infección diferencial entre las células normales y tumorales. Por ejemplo, lo que no pretende ser limitante en modo alguno, se han descrito

otros mutantes virales que se sabe que muestran tropismo para células negativas para STAT1 o PKR que incluyen una cepa del virus de la gripe que no puede inactivar PKR (36). Se sabe que los mutantes de adenovirus que carecen de PKR que inactiva al gen Va crecen mejor en ausencia de PKR.

5 Tal como se describe en el presente documento, se aislaron mutantes de VEV que crecían escasamente en células que responden al interferón. Estos mutantes se seleccionaron basándose en su capacidad para formar pequeñas placas en monocapas de células que responden al interferón. En células que no responden al interferón (es decir, células tumorales), estos mutantes forman grandes placas. La selección de mutantes por el tamaño de la placa en células que responden al interferón permite el aislamiento de virus que crecen escasamente en células normales. Sin embargo, 10 pueden obtenerse otros mutantes de VEV según diferentes criterios de selección. Los mutantes aislados utilizando células que responden al interferón se amplificaron y se probó su capacidad para eliminar células tumorales y normales. El motivo aquí es que los mutantes de VEV, que pueden inducir interferón en células diana, limitarían su propia replicación en una población de células que responden al interferón. Sin embargo, estos mismos virus tendrían un crecimiento ilimitado en células tumorales que carecen de capacidad de respuesta al interferón. Estos mutantes son 15 valiosos, ya que tienen incluso menos efecto citopático en tejidos normales, mientras mantienen la actividad oncolítica, que el VEV de tipo natural.

Se obtuvieron cuatro mutantes (Mut 1-4) basándose en su capacidad para formar placas en monocapas de células que responden al interferón. Estos mutantes y el virus de tipo natural (MOI de 1,0 ufp/célula) se utilizaron para 20 infectar células de melanoma y fibroblastos de prepucio humano normal. Todos los mutantes pudieron eliminar células tumorales de manera eficaz, pero las células normales infectadas con los mutantes incluso después de largos periodos de infección, aparecieron carentes completamente de infección. A esta misma MOI, el VEV de tipo natural demostró un efecto citopático sobre las células normales. Estos resultados indican que los virus mutantes tienen un mayor efecto terapéutico porque eliminan las células tumorales de manera eficaz mientras que evitan a las células normales, y 25 también tienen la capacidad de producir más partículas virales y aumentar la diseminación de los virus por todo el tumor (véase el ejemplo 4). Sorprendentemente, estos mutantes crecen más rápidamente que el VEV de tipo natural (Indiana) en células de carcinoma de colon HCT 116, pero no en las células OSF7 (véase el ejemplo 21 y las figuras 10A y 10B). Se prefieren los mutantes de VEV que muestran un rápido crecimiento en la célula tumoral de interés, pero no en las células normales.

30 Los experimentos iniciales indicaron que los ratones PKR -/- morían con el VEV a través de varias vías de infección, sin embargo, estos ratones no resultaban afectados por las inyecciones intravenosas del virus. Con el fin de determinar si los componentes plasmáticos estaban inactivando el virus con el contacto, se incubó VEV producido a partir de varias fuentes, incluyendo dentro de las células L de ratón, con suero humano (procedente de un donante no infectado normal) y se determinó el título del virus tras la incubación (ejemplo 6). El título viral de VEV producido en 35 células L disminuyó cuatrocientas veces, mientras que el VEV producido en células de melanoma humano no resultó afectado por la incubación en plasma. Estos resultados indican que la elección de la línea celular para la producción del VEV es crítica. Basándose en esta observación es posible seleccionar líneas celulares humanas para aquellas que producen cantidades óptimas de virus que no son sensibles al suero humano.

40 Sin desear adherirse a ninguna teoría, puede ser que la diferencia en estas dos preparaciones de virus refleje la naturaleza de la cohorte de proteínas encontrada en la superficie de las células que producen virus. Como parte de su ciclo de replicación, el VEV se "injerta" a través de la membrana plasmática y adquiere proteínas celulares en su envuelta. Ciertas proteínas encontradas en las células L cuando se expresan en el contexto de la partícula viral 45 podrían activarse completamente. De hecho, se ha demostrado inicialmente que las partículas de retrovirus producidas en ciertas células de ratón se inactivan por el suero, mientras que el mismo virus producido en un subconjunto de líneas celulares humanas no resultó afectado por el plasma. (Pensiero, M. N., *et al.* Hum Gene Ther, 1996. 7: 1095-1101).

50 Las técnicas convencionales para la producción de VEV son difíciles de escalar para la producción industrial. Por lo tanto, se exploró la purificación de VEV, utilizando una matriz de afinidad, por ejemplo cromatografía de afinidad. (Ver Ejemplo 7). Sin embargo, se pueden utilizar también otros protocolos para purificación por afinidad como los conocidos en el estado del arte, por ejemplo, pero sin limitarse a, procesamiento por lotes de una solución de virus y de una matriz de afinidad, precipitando la matriz enlazada con VEV por medio de centrifugación, y aislando el virus. 55 Con el propósito de suministrar el virus con una etiqueta de afinidad para ser utilizada en la purificación del virus, se puede modificar genéticamente el virus, utilizando técnicas bien conocidas en el arte, para expresar una o más etiquetas de afinidad sobre su superficie, preferiblemente como una proteína viral envolvente de fusión, o se pueden modificar por medio de ingeniería genética líneas celulares productoras para expresar una o más etiquetas de afinidad sobre sus membranas plasmáticas que serían adquiridas por el virus mientras germina a través de la membrana, sin 60 embargo, también se pueden utilizar proteínas envoltantes virales endógenas. Una etiqueta de afinidad bien caracterizada involucra el uso de residuos de Histidina que se enlazan a columnas de níquel inmovilizado, sin embargo se entiende que se pueden emplear también otras etiquetas de afinidad.

Se pueden preparar líneas celulares que actúan como productoras universales de VEV, u otros virus, que expresan 65 una proteína quimérica de VEV con enlazamiento de níquel, u otras propiedades de la etiqueta de afinidad. Esta célula productora universal puede ser utilizada para la producción de una proteína quimérica (etiqueta de afinidad) para cualquier virus envuelto (incluidos todos los virus envueltos de ARN y ADN). Para la purificación de los virus que

germinan a través de la membrana nuclear (tal como el virus del Herpes), se modifica por ingeniería genética una etiqueta que va a ser expresada sobre la proteína viral envolvente expresada en la membrana nuclear.

Otras etiquetas de afinidad incluyen anticuerpos, preferiblemente un anticuerpo que reconoce a un péptido particular bajo condiciones de baja salinidad, baja temperatura o en presencia de un catión/anión crítico. Las concentraciones fisiológicas de sal, la elución térmica o la quelación podrían afectar la elución. Se pueden utilizar también anticuerpos generados contra di o tripéptidos utilizados para purificación. De esta forma, dos o más de estas etiquetas sobre la superficie de una partícula viral individual permitirían la purificación secuencial por afinidad del virus.

El VEV puede modificarse genéticamente con el fin de modificar sus propiedades para su uso *in vivo*. Los métodos para la modificación genética de VEV están bien establecidos dentro de la técnica. Por ejemplo, se ha establecido un sistema genético inverso para VEV (Roberts A. y J. K. Rose, Virology, 1998. 247:1-6) que posibilita modificar las propiedades genéticas del virus. Además, pueden utilizarse las técnicas habituales bien conocidas por un experto en la técnica para modificar genéticamente el VEV e introducir los genes deseados dentro del genoma de VEV para producir VEV recombinantes (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

VEV puede dirigirse a un sitio deseado *in vivo* para aumentar la eficacia viral. Por ejemplo, puede utilizarse la modificación de la proteína G del VEV para producir fusiones que se dirijan a sitios específicos para potenciar la eficacia del VEV *in vivo*. Sin embargo, debe entenderse que también pueden modificarse otras dianas de proteína además de la proteína G de VEV para producir tales proteínas de fusión. Tales proteínas de fusión pueden comprender, por ejemplo, pero sin limitarse a, fragmentos Fv de cadena sencilla (Lorimer, I. A., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. 93:14815-20) que tienen especificidad para antígenos tumorales. Un ejemplo de un fragmento Fv de cadena sencilla de este tipo que puede usarse para preparar una proteína G de fusión de VEV, es un fragmento Fv que tiene como diana un receptor de EGF mutante encontrado en aproximadamente el 80% de las células tumorales de cáncer de mama humano.

VEV también puede modificarse para que exprese uno más genes suicidas capaces de metabolizar un profármaco en un metabolito tóxico permitiendo así que las células infectadas por VEV se eliminen mediante la administración de un profármaco. Por ejemplo, el VEV que comprende el gen de citosina desaminasa o el gen de la timidina cinasa del virus herpes, codifica para una enzima que puede convertir ganciclovir o 5-FC, respectivamente, en un compuesto tóxico. Sin embargo, debe entenderse que también pueden emplearse otros genes suicidas. Dado que está bien establecido que los metabolitos de ganciclovir eliminan no sólo las células que expresan TK de VHS, sino también las células de las proximidades inmediatas, el VEVr que comprende estos genes suicidas muestra varias ventajas. Por ejemplo, se aumenta la eliminación eficaz por parte del virus, puesto que una célula infectada elimina a diez o más células tumorales circundantes, además el VEVr que comprende un gen suicida permite la eliminación del virus si se desea de un individuo infectado con el virus. Esto puede ser importante en situaciones en las que no está claro cómo el VEV puede afectar a un individuo. Por ejemplo, un individuo inmunocomprometido puede ser inesperadamente sensible al VEV. Por tanto, la adición de un gen suicida sería una mejora importante para la seguridad del agente terapéutico viral.

El VEV también puede modificarse mediante la introducción de un producto génico de mamífero. Tal producto génico de mamífero limitaría el crecimiento de VEV en las células normales, pero no el crecimiento de VEV en las células tumorales o enfermas. Por ejemplo, el VEVr que puede expresar uno o más transactivadores de p53, activa rutas apoptóticas en las células normales, pero no en las células tumorales. Por tanto, tales VEVr limitan selectivamente la diseminación del virus en los tejidos normales. Sin embargo, debe entenderse que también pueden expresarse otros productos génicos de mamífero dentro de VEV para este fin. Otro ejemplo, que no debe considerarse como limitante en modo alguno, es el gen de PKR. Un VEVr que expresa el gen de PKR limita la replicación del virus en todas las células normales; sin embargo, en las células que expresan inhibidores de PKR, se inactiva la PKR codificada viralmente. Un ejemplo de una célula que expresa uno o más inhibidores de la PKR es una célula infectada de manera crónica por la hepatitis C. Dado que la hepatitis C codifica para y expresa dos inhibidores conocidos de la PKR (es decir, NS5A y E2), un producto génico de PKR codificado por VEV se neutraliza y se permite que VEV se replique libremente.

La descripción anterior no pretende limitar la invención reivindicada en modo alguno; además, la combinación tratada de características podría no ser absolutamente necesaria para la solución inventiva.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos siguientes. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son únicamente para fines ilustrativos y no deben utilizarse para limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

#### Ejemplo 1

##### *Las células negativas para PKR son sensibles a la infección por VEV*

##### *Experimentos in vivo*

Los estudios iniciales se refieren a la identificación de virus que pueden infectar animales y células PKR-/. Utilizando estrategias de recombinación homólogas, se generaron cepas de ratón sin PKR (35) y se probaron para determi-

nar su capacidad para luchar contra infecciones virales. Dado que estos ratones son PKR<sup>-/-</sup>, deben ser sensibles a la infección por virus. Se administraron varias especies de virus a animales sin PKR en un intervalo de concentraciones.

#### *Infección de ratones sin PKR*

Se generó una línea de ratón sin PKR utilizando la tecnología de deficiencia convencional (Abraham, N., *et al.*, J Biol Chem, 1999. 274:5953-5962). Se infectaron grupos de cinco ratones hembra, de 3 meses de edad o mayores, por vía intranasal con diversas cantidades de virus de la estomatitis vesicular (cepa Indiana). Se infectaron en paralelo animales de tipo natural de edad correspondiente y ambos conjuntos de animales se monitorizaron diariamente para determinar signos de infección. Estos incluyen hidratación, piloerección, nivel de actividad, apetito, parálisis de las patas traseras, frecuencia respiratoria, peso corporal y cualquier otro síntoma que indicara que el animal tenía molestias.

Los animales de tipo natural mostraron menos síntomas, y sólo transitorios, en multiplicidades de infección de hasta 10<sup>5</sup> ufp con VEV. Por el contrario, los animales sin PKR desarrollaron muy rápidamente deshidratación, piloerección, pérdida de apetito, frecuencia respiratoria rápida, disminución de la actividad y ojos estrábicos irritados. A dosis altas de infección por VEV (10<sup>5</sup> ufp), los animales mostraron síntomas en menos de 24 horas y normalmente sucumbieron a la infección en el plazo de 48 horas. A dosis de infección de tan solo 25 ufp, el 100 por cien de los animales sin PKR murieron por la infección de VEV en el plazo de 5 días. En experimentos separados, se sacrificaron grupos de cinco animales de tipo natural y sin PKR a las 48 horas tras la infección con VEV y se extirparon los órganos para evaluar los títulos virales. En los animales con PKR, se encontraron títulos de más de un millón de UFP/ml de homogeneizado de pulmón en este tiempo, mientras que en los animales de tipo natural, los títulos virales oscilaron desde 0 hasta 100 ufp por ml de homogeneizado de pulmón. En los animales de tipo natural y sin PKR, se encontraron cantidades similares de virus en el cerebro. El resto de los tejidos de ambas cepas de ratón tenían virus indetectables en este tiempo tras la infección.

El virus de la estomatitis vesicular, un miembro de la familia de rabdovirus, pudo matar al 100% de los animales sin PKR tras la infección intranasal mediante tan solo 50 partículas virales infecciosas (o unidades formadoras de placa, ufp). Por el contrario, se requirió un número más de 20.000 veces mayor de partículas de VEV para matar a la mitad de las camadas normales infectadas. Estos resultados indican que los animales sin PKR pueden inhibir varias infecciones por virus, incluyendo la del virus vaccinia, de la gripe y EMCV. Sin embargo, el VEV mostró capacidad para infectar animales PKR<sup>-/-</sup>. Estos resultados también indican que las células de mamífero requieren la PKR para resistir las infecciones por el VEV (cepa de laboratorio Indiana).

#### *Ejemplo 2*

##### *Eliminación selectiva de células tumorales con VEV*

##### *Experimentos in vitro*

Se escogieron aleatoriamente varias líneas de células tumorales del Ottawa Regional Cancer Center (Centro de Cáncer Regional de Ottawa) y se probaron para determinar su susceptibilidad a la infección por VEV. Como células control se utilizaron cultivos de fibroblastos primarios procedentes de voluntarios adultos sanos o muestras de médula ósea primarias de donantes sanos.

##### *Infección de células tumorales por VEV*

Como primera prueba de las propiedades oncolíticas del VEV, se evaluó la producción de virus y el efecto citopático tras una incubación durante la noche con VEV. Se incubaron monocapas de células con la cepa Indiana de VEV a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 unidades formadoras de placa (ufp). Tras permitir que el virus se adsorbiera durante 30 minutos a 37°C, se enjuagaron los cultivos meticulosamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se cultivaron durante 18 horas adicionales a 37°C. En ese momento, se examinaron los cultivos microscópicamente para determinar el efecto citopático (cpe) y se fotografiaron. Se eliminó el sobrenadante tras las 18 horas y se determinaron los títulos de virus por ml de medio. En algunos experimentos, los cultivos se preincubaron durante 12 horas con interferón alfa humano (100 unidades/ml) antes de la infección.

Para examinar la cinética de la infección de los tipos celulares variados, se utilizó un ensayo modificado de cpe (Heise, C., *et al.*, Nat Med, 1997. 3:639-645). Esencialmente, las monocapas de células se infectaron a una MOI de 0,1 ufp en una placa de 12 pocillos. A tiempo 0 y cada 12 horas posteriormente hasta las 48 horas, se fijó un pocillo de células infectadas con 0,5 ml de fijación Leukostat (Fisher Diagnostics) durante 2 minutos. Al final del experimento, se tiñeron las monocapas con tinciones de Leukostat 1 y 2 siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que PKR es un producto génico inducible por el interferón, se probó el pretratamiento con interferón, 100 unidades/ml de interferón alfa humano 12 horas antes de la infección, para determinar si el interferón podría potenciar la protección dentro de cultivos celulares variados. Los datos se presentan en la tabla 1 y en las figuras 2 - 3.

# ES 2 320 239 T3

TABLA 1

*Líneas celulares probadas para determinar la sensibilidad a VEV*

Línea celular	Tipo celular	Referencia	Rendimiento con virus no tratado durante la noche	Rendimiento con virus tratado durante la noche con interferón
OSF 16	fibroblastoma humano normal	ORCC <sup>1</sup>	1 X 10 <sup>5</sup> ufp	0 ufp
AG1522	fibroblastoma de prepucio humano	[20]		0 ufp
OSF 7	fibroblastoma humano normal	ORCC	1 X 10 <sup>6</sup>	0 ufp
OSF12	fibroblastoma humano normal	ORCC	2 X 10 <sup>5</sup> ufp	0 ufp
MN11	fibrosarcoma de ratón	[21]	1 X 10 <sup>8</sup>	1 X 10 <sup>4</sup>
A2780	carcinoma de ovario humano	[22]	2 X 10 <sup>8</sup>	1 X 10 <sup>7</sup>
H-1078	médula ósea humana normal	ORCC	0 ufp (MOI 10 ufp)	No determinado
M07E	línea celular leucémica humana	[23]	2 X 10 <sup>6</sup> (MOI 1,0 ufp)	No determinado
L1210	línea celular leucémica de ratón	[24]	4 X 10 <sup>6</sup>	2 X 10 <sup>4</sup>
SK-MEL3	melanoma humano	[25]	No determinado: ensayo cpe positivo	No determinado: ensayo cpe positivo
LNCAP	carcinoma de próstata humano	[26]	No determinado: ensayo cpe positivo	No determinado: ensayo cpe positivo

Línea celular	Tipo celular	Referencia	Rendimiento con virus no tratado durante la noche	Rendimiento con virus tratado durante la noche con interferón
293T	fibrosarcoma transformado con T grande de SV-40 y E1A de adenovirus.	[27]	$1 \times 10^8$	$8 \times 10^7$
OVCA 432		[28]	$1 \times 10^7$	0 ufp
C13	carcinoma de ovario	[29]	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^5$
OVCA 3		[30]	$5 \times 10^7$	No determinado
COS	línea celular de riñón de simio transformada con T grande	[31]	$2 \times 10^8$	No determinado
HCT 116	carcinoma de colon	[32]	No determinado: ensayo cpe positivo	No determinado: ensayo cpe positivo
OVCA 420		[28]	$1 \times 10^8$	$3 \times 10^6$

1 establecido en el ORCC (Ottawa Regional Cancer Center) a partir de biopsia de antebrazo.

A partir de los datos de la tabla 1 puede observarse que, aunque los fibroblastos humanos normales pueden soportar la replicación viral, la cantidad de virus producidos y la progresión a la lisis celular se retrasó sustancialmente cuando se comparaba con las células tumorales. Se observó una diferencia incluso más sustancial en la producción de virus tras el pretratamiento con interferón. Aunque las monocapas de fibroblastos humanos normales se protegieron completamente del efecto citolítico del VEV mediante el interferón, las células tumorales permanecieron sensibles, produciendo abundantes cantidades de partículas virales y experimentando rápidamente citolisis.

También se encontró que otras líneas celulares, incluyendo una línea celular de carcinoma de pulmón (LC80) y una línea celular de leucemia, las células de AML5 (leucemia mielógena aguda 5), se eliminaban eficazmente mediante el VEV. En el caso de AML5, a una MOI de 1,0 ufp/ml, las células se eliminaron completamente en el plazo de 24 horas, mientras que a 0,0001 ufp/ml, las células se eliminaron en el plazo de 72 horas, indicando adicionalmente la sensibilidad de las células de leucemia al VEV.

Tal como se observa en la figura 2, las monocapas de células tumorales se destruyeron mucho más rápidamente mediante la infección por VEV en comparación con los fibroblastos humanos normales. La línea celular de melanoma humano SK-MEL3, la línea celular de cáncer de próstata LNCaP y las células de carcinoma de ovario A2780, mostraron todas cep sustancial tan solo a las 12 horas tras la infección. Aunque los cultivos de fibroblastos humanos normales se infectaron y pudieron producir virus (véase la tabla 1), la cinética de la infección fue sustancialmente más lenta que en las tres líneas celulares tumorales probadas en este experimento. Además, al igual que con el ensayo de crecimiento del virus durante la noche (tabla 1, figura 2), el tratamiento con interferón alfa protegió completamente a los fibroblastos humanos normales, pero fue ineficaz en la protección de tres líneas celulares tumorales del efecto citopático del VEV.

Los resultados obtenidos para la tabla 1 demuestran que puede emplearse una estrategia de selección para determinar los tipos de tumores que son susceptibles de eliminarse por el VEV utilizando, por ejemplo, pero sin limitarse a, el panel convencional de NIH (National Institutes of Health, Instituto Nacional de Salud)/NCI (National Cancer Institute, Instituto Nacional contra el Cáncer) de líneas celulares de tumor disponibles de la ATCC (American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo). Estas líneas celulares se seleccionan con el fin de determinar el tiempo para completar el cpe y/o el crecimiento del virus utilizando varias multiplicidades iniciales de infección. Estos

experimentos se realizan en presencia y ausencia de interferón, de modo que se determine el número de y los tipos de tumores que son sensibles a VEV y son resistentes a la actividad antiviral del interferón.

#### *Tratamiento de la leucemia con VEV*

El VEV no infecta productivamente a las células madre de la médula ósea, incluso con una alta MOI de 10 ufp/célula (H-1078, tabla 1). Los cultivos tratados mantenían todas las características de sus células madre. Se eliminaron dos líneas celulares de leucemia (MO7E y L1210; tabla 1) tras una infección durante la noche y se produjeron grandes cantidades del virus.

Para determinar si el VEV podría eliminar células de leucemia primaria de un paciente con cáncer, se obtuvo una muestra de sangre periférica de un paciente con LMA (leucemia mielocítica aguda) y se recogieron los glóbulos blancos y se sembraron en placa en medio RMPI más 10% de FBS (suero bovino fetal) ( $10^7$ /pocillo en placas de 6 pocillos, cada infección por duplicado). Las células se infectaron con simulación o se infectaron a una MOI de 10,0/célula. El VEV eliminó selectivamente las células leucémicas mieloides, tal como se indica por la disminución en el porcentaje de blastocitos (blastocitos leucémicos), mientras que el número global de células resultó mínimamente afectado (es decir, neutrófilos desarrollados). La muestra leucémica produjo títulos de VEV que superaban  $10^7$  ufp/ml a las 16 horas tras la infección. El número de blastocitos en la muestra se redujo espectacularmente a las 21 horas tras la infección, mientras que aumentó la proporción de neutrófilos normales. Las células infectadas con simulación (-VEV) contenían casi un 70% de blastocitos en una monocapa, mientras que en las células infectadas con VEV (+VEV), predominaban las células normales. Estos resultados demuestran que VEV puede eliminar preferentemente blastocitos leucémicos primarios, mientras que evita a las células sanguíneas normales.

#### *Ejemplo 3*

##### *Eliminación de células tumorales en cultivos mixtos*

Se co-cultivaron fibroblastos humanos normales y células tumorales 293T en una mezcla 50:50. Dado que las células 293T expresan el antígeno T grande que no se encuentra en las células normales, los dos tipos de células pueden diferenciarse por inmunofluorescencia.

En este experimento, se infectaron cultivos a una MOI de 0,1 ufp/célula y se permitió que la infección continuara en presencia o ausencia de interferón. A las 0, 18 y 24 horas (figura 4), se fijaron los cultivos y se tiñeron con anticuerpos frente al antígeno T grande (núcleos rojos) para detectar las células 293T y con DAPI (núcleos azules) que tiñe todos los tipos de células (figura 4). Inicialmente, ambos tipos de células mostraron una morfología similar a un huso con grandes núcleos ovales. Tras 18 horas, el número de células 293T (núcleos rojos) se redujo y muchas de las células 293T restantes mostraron una morfología nuclear alterada. Hacia las 24 horas tras la infección, se detectaron muy pocas células 293T y las pocas que quedaban mostraron núcleos gravemente condensados o fragmentados característicos de una célula que está muriendo por apoptosis inducida viralmente.

Esta destrucción selectiva de las células transformadas se ha observado tanto en presencia como en ausencia de interferón. Los fibroblastos normales no desarrollaron cambios nucleares ni su número se redujo en respuesta a la infección por VEV, aun cuando las células 293T estaban produciendo abundantes cantidades de virus dentro del cultivo.

#### *Ejemplo 4*

##### *Mutantes de VEV como agentes oncolíticos*

Se aislaron mutantes de VEV basándose en su capacidad para formar placas pequeñas en monocapas de células que responden a interferón, en comparación con el tamaño de las placas en monocapas de células que no responden al interferón. Se recogieron aislados virales, que forman placas pequeñas en las células que responden al interferón, se amplificaron y se volvieron a clonar. Los mutantes aislados de esta forma se amplificaron y se probaron para determinar su capacidad para eliminar células tumorales y normales. El fundamento aquí es que los mutantes de VEV, que pueden inducir interferón en las células diana, limitarían su propia replicación en una población de células que responden al interferón. Sin embargo, estos mismos virus tendrían un crecimiento ilimitado en las células tumorales que carecen de capacidad de respuesta al interferón. Estos mutantes serían valiosos, ya que deben tener incluso menos efecto citopático sobre tejidos normales mientras que mantienen su actividad oncolítica.

Se obtuvieron cuatro mutantes (Mut 1-4) basándose en su capacidad para formar placas pequeñas en monocapas de células que responden al interferón. Dr. Lauren Poliquin (Universidad de Quebec en Montreal) identificó inicialmente estos mutantes y los facilitó. Tras cinco rondas de purificación de las placas, estos mutantes y el virus de tipo natural (MOI de 1,0 ufp/célula) se utilizaron para infectar células de melanoma y fibroblastos de prepucio humano normales y se determinaron los títulos de los virus liberados 12 y 24 horas tras la infección.

Todos los mutantes pudieron eliminar células tumorales eficazmente, pero las células normales infectadas con los mutantes incluso tras largos puntos de tiempo aparecieron completamente sin infectar. A esta misma MOI, el VEV de tipo natural demostró un efecto citopático sobre las células normales. También se observó que todos los mutantes

de VEV producían aproximadamente diez veces más virus que el VEV de tipo natural tras una infección durante la noche de células de melanoma. En las células normales, aunque los Mutantes 1-4 tenían significativamente menos efecto citopático que el VEV de tipo natural, se produjeron cantidades similares de virus procedentes de los cultivos infectados. Estos resultados indican que los virus mutantes tienen un mayor efecto terapéutico ya que eliminan las células tumorales eficazmente mientras que evitan a las células normales, y que también tienen la capacidad para producir más partículas de virus y de aumentar la diseminación del virus por todo el tumor.

#### Ejemplo 5

##### 10 *Infección de ratones desnudos que llevan xenoinjertos de tumores humanos*

Se implantaron células de melanoma humano en ratones desnudos y se dividieron en grupos. Un grupo recibió una inyección de simulación (VEV(-)), y al otro se inyectó VEV de tipo natural o se inyectaron células de melanoma adicionales infectadas *in vitro* con VEV durante una hora antes de la inyección en el sitio del tumor con el fin de administrar células que producirían continuamente partículas infectivas al tumor durante un periodo de varias horas (VEV(+)). Los resultados de estos experimentos se observan en la figura 5 que muestra el promedio del área del tumor con el tiempo en los animales tratados y en los inyectados con simulación.

En el caso de los animales inyectados con simulación (VEV(-); inyección con vehículo solo), los tumores crecieron continuamente durante el transcurso del experimento. Los animales que sólo recibieron virus puros mostraron inicialmente un crecimiento continuo de los tumores, aunque en el día 4 tras la infección los tumores comenzaron a reducirse y continuaron haciéndolo durante el transcurso de este experimento. Los tumores que se inyectaron con células infectadas demostraron las regresiones más espectaculares. Esencialmente la mayor parte de los tumores detuvieron su crecimiento y experimentaron un retroceso a pequeños nódulos duros que parecían tejido cicatrizal.

En algunos de los tumores inyectados más grandes se formaron úlceras en el tumor en el plazo de 1 - 2 días (véase la figura 6), seguido por la reducción continua del cáncer que crece rápidamente una vez. Aunque tanto la inyección del virus purificado como de las células de melanoma infectadas produjo regresiones significativas, las células productoras infectadas fueron más eficaces.

#### 30 Ejemplo 6

##### *La elección de la línea celular para producir VEV afecta a la sensibilidad del virus con respecto al plasma*

Los experimentos anteriores indicaron que los ratones PKR -/- morían con VEV a través de varias vías de infección; sin embargo, estos ratones no resultaban afectados por inyecciones intravenosas del virus. Sin desear adherirse a ninguna teoría, esto podría deberse a que las células endoteliales vasculares PKR -/- proporcionan una barrera a la infección tisular o a que los componentes del plasma estaban inactivando el virus con el contacto. Para probar esta última idea, se incubó VEV producido a partir de varias fuentes, incluyendo dentro de las células L de ratón, con suero humano (procedente de donantes no infectados humanos) y se determinó el título del virus tras la incubación.

Tras la incubación de VEV en suero humano, el título viral de VEV producido en células L disminuyó cuatrocientas veces. Por otra parte, el VEV producido en las células de melanoma humano no resultó afectado por la incubación en plasma.

Estos resultados indican que la elección de la línea celular para la producción de VEV es crítica. Basándose en esta observación es posible seleccionar líneas celulares humanas para encontrar las que producen cantidades óptimas de virus que no es sensible al suero humano.

#### 50 Ejemplo 7

##### *Estrategia para la concentración y purificación de VEV*

Las técnicas convencionales para la producción de VEV incluyen etapas de centrifugación y purificación por gradiente, siendo ambas difíciles de escalar para producción industrial. Por lo tanto, se han explorado protocolos alternativos para la purificación de VEV, por ejemplo columnas de afinidad para la concentración y purificación simultánea de las partículas de virus.

Con el propósito de proveer al virus con la etiqueta de afinidad que va a ser utilizada para la purificación del virus, se pueden utilizar proteína endógenas o, se puede modificar por ingeniería genética el virus para que exprese una o más etiquetas de afinidad sobre su superficie, o se pueden modificar por ingeniería genética líneas celulares productoras para que expresen una o más etiquetas de afinidad sobre sus membranas plasmáticas que serían adquiridas por el virus mientras germina a través de la membrana. Las únicas proteínas de la envoltura viral pueden ser purificadas utilizando cromatografía de afinidad.

Una de tales etiquetas de afinidad puede involucrar el uso de residuos de Histidina que se enlazan a una columna de níquel inmovilizado, sin embargo, se entiende que se pueden emplear también otras etiquetas de afinidad. Esta aproximación ha sido analizada utilizando el virus bacteriano M13. Utilizando un sistema que exhibe un péptido



de fago (Kolynen, E. y colaboradores, J. Nucl. Med., 1999. 40883 - 888), se seleccionaron partículas virales que expresan péptidos que contienen Histidina que se enlazan a columnas de níquel, pero que pueden ser eluidos con imidazol, que incluyen:

5 CTTHRHHTSNC 8seq id no: 1); CLNAHRTTHHC (SEQ ID NO: 2); CHGLHSNMRHC (SEQ ID NO: 3); CHHHHRLNC (SEQ ID NO: 4); CHSHHHRGC (SEQ ID NO: 5); CWDHHNHHC (SEQ ID NO: 7); CHHHRISSHC (SEQ ID NO: 8). La expresión de estos péptidos sobre la superficie del fago M13 resultó en la concentración de purificación del virus sobre resinas de níquel y su elusión utilizando bajas concentraciones imidazol.

10 Una o más de estas secuencias se pueden integrar dentro de la proteína G de VSV lo que resulta en una mayor concentración de las partículas virales que soportan estos péptidos sobre los residuos de níquel. Se espera que el virus eluido retenga su infectividad.

15 De esta forma, se produce una línea celular que pueda ser un productor universal de VSV, o de otros virus, que exprese una proteína quimérica de VSV con propiedades de enlazamiento de níquel. Esta célula productora universal puede ser utilizada para la producción de tal proteína quimérica (etiqueta de afinidad) para cualquier virus envuelto (incluidos todos los virus envueltos de ARN y ADN). Para la purificación de los virus que germinan a través de la membrana nuclear (tal como el virus del Herpes), se modifica por ingeniería genética una etiqueta que va a ser expresada sobre la proteína viral envolvente expresada en la membrana nuclear.

20 Otras etiquetas de afinidad incluyen anticuerpos, preferiblemente un anticuerpo que reconoce a un péptido particular bajo condiciones de baja salinidad, baja temperatura o en presencia de un catión/anión crítico. Las concentraciones fisiológicas de sal, la elución térmica o la quelación podrían afectar la elución. Se pueden utilizar también anticuerpos generados contra di o tripéptidos utilizados para purificación. De esta forma, dos o más de estas etiquetas sobre la superficie de una partícula viral individual permitirían la purificación secuencial por afinidad del virus.

#### Ejemplo 8

##### *Uso de VEV para tratar infecciones crónicas*

30 Algunos trastornos en seres humanos surgen como resultado de infecciones virales crónicas, incluyendo la infección por herpes latente, hepatitis, SIDA y cáncer cervical. En cada uno de estos casos, el agente viral causante ha desarrollado mecanismos para inactivar los componentes de la ruta de respuesta del interferón incluyendo la PKR (por ejemplo, Chelbi-Alix, M. K. y H. de The, Oncogene, 1999. 18:935-941; Gale, M. J., Jr., *et al.*, Virology, 1997. 230:217-227; Gale, M. J., *et al.*, Clin Diagn Virol, 1998. 10:157-162; Gale, M., Jr. y M. G. Katze, Methods, 1997. 11:383-401; Barnard, P. y N. A. McMillan, Virology, 1999. 259: 305-313). Por tanto, la administración de VEV, o de mutantes de VEV que inducen el interferón, o una combinación de los mismos, a individuos que padecen estos trastornos, elimina selectivamente las células infectadas de manera crónica. Podría encontrarse eficacia terapéutica adicional mediante la selección como diana a través de receptores de células o virus únicamente de las células infectadas de manera crónica.

#### Ejemplo 9

##### *Modificación genética de VEV*

45 Se ha establecido un sistema genético inverso para VEV (Roberts A. y J. K. Rose, Virology, 1998. 247:1-6) lo que hace posible modificar las propiedades genéticas de los virus.

##### *Selección como diana de VEV hacia sitios deseados in vivo*

50 En la actualidad, el VEV puede unirse a la mayor parte de los tipos celulares de mamífero aunque puede limitarse su replicación una vez dentro de la célula (es decir, mediante productos génicos que responden al interferón, incluyendo la PKR). Por tanto, la dosis eficaz del virus que puede unirse realmente a las células diana (es decir, a las células tumorales) para la infección productiva puede limitarse enormemente sólo mediante la "reducción" que proporcionan otros tejidos normales. Por tanto, VEV puede modificarse genéticamente con el fin de unirse e infectar sólo células tumorales.

60 Se utilizan técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) para modificar la proteína G de VEV. Los fragmentos Fv de cadena sencilla (Lorimer, I. A., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. 93:14815-20) que tienen especificidad por los antígenos tumorales se fusionan con la proteína G de VEV. Un ejemplo de tal fragmento Fv de cadena sencilla es uno que selecciona como diana al receptor de EGF mutante que se encuentra en aproximadamente el 80% de las células de cáncer de mama humano.

##### *Expresión de genes suicidas dentro de VEV*

El genoma de VEV se modifica de modo que comprende el gen de la citosina desaminasa o el gen de la timidina cinasa del virus herpes. Ambos genes codifican para enzimas que pueden convertir profármacos en compuestos tóxicos

(por ejemplo, ganciclovir o 5-FC). Los virus modificadas de este modo expresan estos genes suicidas, permitiendo así que se eliminen células infectadas por VEV mediante la administración del profármaco. Esto proporciona dos ventajas puesto que (1) está bien establecido que los metabolitos del ganciclovir eliminan no sólo las células que expresan TK de VHS, sino también las células de las proximidades inmediatas. Este “efecto espectador” (“by-stander effect”) puede aumentar la eliminación eficaz por parte del virus (es decir, una célula infectada podría dar como resultado la muerte de diez o más células tumorales circundantes); y (2) tener un VEV con un gen suicida podría permitir la eliminación del virus si se desea de un individuo infectado con el virus.

#### *Control del crecimiento de VEV in vivo*

Se introduce un producto génico de mamífero dentro de VEV para limitar el crecimiento de VEV en las células normales pero este producto génico no afecta al crecimiento de VEV en las células tumorales o enfermas.

Los VEV recombinantes (VEVr) que comprenden uno o más transactivadores de p53, activan las rutas apoptóticas en células normales pero no en células tumorales. Tales VEVr limitan la diseminación del virus en tejidos normales pero permiten el crecimiento de los virus en las células tumorales.

El VEVr que comprende el gen de PKR limita la replicación del virus en todas las células normales; sin embargo, en las células que expresan inhibidores de la PKR, la PKR codificada viralmente está inactivada. Un ejemplo de una célula que expresa uno o más inhibidores de la PKR es una célula infectada por hepatitis C de manera crónica. Dado que la hepatitis C codifica y expresa dos inhibidores conocidos de PKR (es decir, NS5A y E2), un producto génico de PKR codificado por VEV se neutraliza y se permite que VEV se replique libremente.

#### *Ejemplo 10*

##### *Pérdida progresiva de capacidad de respuesta al interferón con la transformación oncogénica*

Se infectaron fibroblastos murinos en varias fases de la transformación, o bien pretratados con 100 unidades de interferón alfa o sin tratar, con VEV WT Indiana a una MOI de 0,1 ufp/célula. La producción viral se midió 18 horas p.i. (tras la infección) mediante un ensayo en placa habitual. MEF: cultivos primarios de fibroblasto de ratón aislados de embriones de ratón Balb/C. Células NIH 3T3: fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados. PVSrc: Células NIH 3T3 transformadas con el gen src viral. MOP 8: Células NIH 3T3 transformadas con el antígeno T grande del virus del polio. Los resultados se muestran en la tabla 2.

En este ejemplo, la pérdida de la capacidad de respuesta al interferón guarda relación con la sensibilidad a la infección por VEV y a la progresión del fenotipo maligno. Las células MEF son mortales (es decir, tienen una vida limitada en cultivo) y pueden responder completamente al interferón. Las células NIH 3T3, aunque no son tumorigénicas, están inmortalizadas y tienen aproximadamente diez mil veces más capacidad de respuesta al interferón que MEF. Las células PVSrc y MOP 8 son completamente tumorigénicas, soportan la replicación vigorosa de VEV y están mínimamente protegidas por el tratamiento con interferón.

TABLA 2

Línea celular	Título viral (ufp/ml)	
	No tratadas	IFN- $\alpha$
MEF (fibroblasto embrionario de ratón)	$4 \times 10^6$	< 10
NIH3T3	$8 \times 10^7$	$1 \times 10^4$
PVSrc	$3 \times 10^9$	$2 \times 10^7$
MOP 8	$1 \times 10^8$	$5 \times 10^6$

#### *Ejemplo 11*

##### *Rendimiento del virus tras infección durante la noche de varias líneas celulares tratadas o no tratadas con IFN*

Una variedad de líneas celulares normales y transformadas se dejaron sin tratar o se pretrataron con 100 unidades de IFN- $\alpha$ , se infectaron a una MOI de 0,1 ufp/ml con VEV WT Indiana y se incubaron durante 18 horas a 37°C. Los medios de cultivo procedentes de cada muestra se titularon para determinar la producción de VEV. Los resultados se muestran en la tabla 3.

## ES 2 320 239 T3

Este ejemplo demuestra que la producción viral es de diez a diez mil veces más eficaz en una variedad de tipos de células tumorales, en comparación con los tejidos primarios normales. En presencia del interferón alfa, la producción de virus en las células primarias normales está casi completamente bloqueada, mientras que en las células tumorales, el interferón tiene poco o ningún efecto sobre la replicación de VEV.

TABLA 3

Línea celular	Título viral (ufp/ml)	
	No tratadas	IFN- $\alpha$
OSF7 (fibroblasto humano normal primario)	$1 \times 10^6$	< 10
OSF12 (fibroblasto humano normal primario)	$2 \times 10^5$	< 10
OSF16 (fibroblasto humano normal primario)	$1 \times 10^5$	< 10
PrEC (epitelio de próstata humano normal primario)	$8 \times 10^6$	< 10
HOSE (epitelio de la superficie del ovario humano normal primario)	$1 \times 10^7$	< 1000
A2780 (carcinoma de ovario humano)	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^7$
OVCA 420 (carcinoma de ovario humano)	$1 \times 10^8$	$3 \times 10^6$
C13 (carcinoma de ovario humano)	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^5$
LC80 (carcinoma de pulmón humano)	$2 \times 10^9$	$6 \times 10^7$
SK-MEL3 (melanoma humano)	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^9$
LNCAP (carcinoma de próstata humano)	$4 \times 10^9$	$5 \times 10^9$
HCT116 (carcinoma de colon humano)	$1 \times 10^9$	$2 \times 10^9$
293T (células HEK transformadas con antígeno T y E1A de adenovirus)	$1 \times 10^8$	$8 \times 10^7$

### Ejemplo 12

*DL<sub>50</sub> para VEV WT y mutante administrados por vía intranasal a ratones PKR<sup>+/-</sup> (129 x Balb/c)*

Se anestesiaron ratones hembra de 8 - 10 semanas de edad y se infectaron por vía intranasal con el virus diluido en 50  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en las fosas nasales de cada animal (PKR<sup>+/-</sup>; 129 x variedad Balb/c). Se calcularon los valores de la dosis letal 50 utilizando el método de Korler-Spearman. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Este ejemplo demuestra que los mutantes I, II y III en particular, están atenuados en comparación con la cepa Indiana de tipo natural del virus cuando se prueban para determinar su toxicidad en 129 X ratones Balb/c.

TABLA 4

Virus	DL <sub>50</sub> intranasal (ufp)
WT Indiana	1 x 10 <sup>4</sup>
Mutante I	1 x 10 <sup>10</sup>
Mutante II	>1 x 10 <sup>10</sup>
Mutante III	3 x 10 <sup>8</sup>
Mutante IV	<1 x 10 <sup>5</sup>

## Ejemplo 13

*Los ratones PKR<sup>-/-</sup> son sumamente sensibles a VEV, en comparación con varias cepas de ratón PKR<sup>+/+</sup>*

Se infectaron por vía intranasal ratones PKR<sup>-/-</sup> y PKR<sup>+/+</sup> en varias dosis y se monitorizó su supervivencia a lo largo del tiempo. Todos los ratones PKR<sup>-/-</sup> sucumbieron a la infección entre los días 2 y 5, dependiendo de la dosis, mientras que los ratones control permanecieron vivos más allá de este punto. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Este ejemplo demuestra la importancia del producto génico de PKR en la resistencia de los ratones a la infección por VEV.

TABLA 5

Antecedentes genéticos	Dosis i.n.	Supervivencia en el día 5
PKR <sup>+/+</sup> Balb/c	5 x 10 <sup>4</sup>	5/5
CD-1	5 x 10 <sup>4</sup>	5/5
Balb/c x 129	5 x 10 <sup>4</sup>	5/5
PKR <sup>-/-</sup> Balb/c x 129	5 x 10 <sup>4</sup>	0/5
	5 x 10 <sup>3</sup>	0/4
	5 x 10 <sup>2</sup>	0/3
	5 x 10 <sup>1</sup>	0/3

## Ejemplo 14

*Las células AML3 mueren por apoptosis tras la infección por VEV*

Se infectaron células OCI/AML3 (leucemia mielógena aguda) con VEV a una MOI de 3,0 ufp/célula. Se analizaron las muestras sin fijar catorce y veinte horas tras la infección. Las células apoptóticas con translocación de fosfatidilserina a través de la membrana se detectaron mediante citometría de flujo utilizando la proteína fluorescente roja anexina - V- biotina - X/NeutrAvidina - PE (Molecular Probes). Se analizó la despolarización de la membrana mitocondrial en las células apoptóticas tempranas mediante citometría de flujo utilizando el colorante sensible al potencial, JC-1 (Molecular Probes). JC-1 se acumula por la mitocondria polarizada que cambia la emisión de fluorescencia del espectro verde al rojo. Las células AML3 no viables se identificaron utilizando colorante vital fluorescente rojo de homodímero de etidio-1 (EthD-1) (Molecular Probes). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Este ejemplo demuestra que VEV elimina a las células de AML, al menos en parte, a través de una ruta apoptótica inducida viralmente.

# ES 2 320 239 T3

TABLA 6

	Pruebas		MOI 0,0	MOI 3,0	Positivos netos (muertos)
			Porcentaje de positivos	Porcentaje de positivos	
14 horas p.i.	EthD-1		6,6	32,3	25,7
	Anexina V		14,3	52,7	38,4
	JC-1		7,5	21,4	13,4
					15
20 horas p.i.	Positiva para EthD-1		6,4	58,5	52,1
	Positiva para anexina V		10,8	79,6	68,8
	JC-1		3,9	43,2	39,3

## Ejemplo 15

*Las cepas de VEV mutantes infectan y eliminan células de AML*

Se infectaron células OCI/AML3 (leucemia mielógena aguda) a una MOI de 1,0 y se incubaron durante 23 horas. Las células no fijadas se tiñeron con Eth-D1 (dímero de etidio, Molecular Probes) para detectar las células no viables siguiendo las especificaciones de los fabricantes. El número de células teñidas por 10.000 contadas se utilizó para calcular el porcentaje de muertes. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Este ejemplo demuestra que las cepas VEV mutantes utilizadas son tan eficaces como la cepa Indiana de tipo natural en la eliminación de las células de AML.

TABLA 7

	Simulaci ón	WT IND	Mut I	Mut II	Mut III	Mut IV	Mut V
Porcentaje de muertes	30,0	64,7	60,7	86,7	72,1	74,4	82,8

## Ejemplo 16

*VEV y las células infectadas por VEV muestran actividad antitumoral frente a xenoinjertos de melanoma en humanos en ratones desnudos*

Se desarrollaron tumores derivados de SK-MEL 3 (melanoma) en ratones atímicos Balb/c hembras de 8 - 10 semanas de edad. En el día 0, los tumores o bien se dejaron sin tratar o se infectaron con  $10^8$  ufp de VEV WT Indiana en medio de cultivo o  $2,5 \times 10^6$  células SK-MEL 3 infectadas por VEV WT Indiana (células que producen VEV). Se calcularon las diferencias estadísticas entre los grupos tratados y los no tratados en cada punto de datos con los siguientes valores de confianza (b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$ ; d:  $p = 0,007$ ). Los resultados se muestran en la figura 7. En el día 3, sólo los tumores tratados con células que producen VEV fueron significativamente más pequeños que los tumores no tratados (a:  $p < 0,001$ ). No fueron evidentes diferencias estadísticamente significativas en los volúmenes tumorales entre los grupos desde el día 0 hasta el día 2. Los puntos de datos representan las medias  $\pm$  EEM de múltiples tumores (no tratados  $n = 8$ ; células que producen VEV  $n = 8$ ; VEV solo  $n = 4$ ).

Este ejemplo demuestra que una única inyección de VEV, directamente en tumores sólidos afecta profundamente al crecimiento del tumor, dando como resultado la regresión de parcial a completa. El uso de células tumorales infectadas como vehículo para administrar el virus también es eficaz.

## Ejemplo 17

*Los ratones PKR<sup>-/-</sup> son extremadamente sensibles a la infección por VEV intranasal y demuestran una deficiencia en la resistencia mediada por IFN*

Ratones PKR<sup>-/-</sup> (A y B) y ratones control (Balb/c x 129) se infectaron por vía intranasal con  $5 \times 10^4$  ufp de VEV y se monitorizaron para determinar la morbilidad y la supervivencia durante el transcurso de 14 días, tras los cuales se consideró que los animales que quedaban habían sobrevivido a la infección.

Los resultados se muestran en las figuras 8A y 8B. Los ratones PKR<sup>-/-</sup> mostraron una grave disminución de la supervivencia en comparación con los ratones control (WT), que sucumbieron hacia el día 3 ó 4, mientras que todos los ratones control sobrevivieron a la infección. El pretratamiento con IFN- $\alpha/\beta$  (18 h antes de la infección) con  $2 \times 10^4$  U.I. (figura 8A) o bien con  $2 \times 10^5$  UI no produjo efecto protector en los animales PKR<sup>-/-</sup>.

Este ejemplo demuestra que un único defecto en la ruta del interferón (ausencia del producto génico de PKR) es suficiente para hacer que los ratones no puedan resistir a las infecciones por VEV. Este defecto no puede salvarse por el interferón.

## Ejemplo 18

*El interferón puede proteger a ratones desnudos que llevan xenoinjerto durante el tratamiento con VEV*

Se inyectaron por vía intradérmica células de melanoma SK-MEL 3 en ratones desnudos atímicos CD-1. En el día 0, se inyectó a los tumores o bien VEV WT Indiana vivo ( $1 \times 10^9$  ufp) o bien una cantidad equivalente de VEV inactivado por UV, y se midió diariamente. Los resultados se muestran en la figura 9. Se administró interferón a un subconjunto de animales (VEV IFN) en los momentos indicados (flechas negras). (UV-VEV  $n = 4$ ; VEV IFN  $n = 6$ ; VEV  $n = 6$ ). En estos experimentos, una única inyección intratumoral de VEV inhibe el tumor en todos los casos. Todos los tumores tenían al menos una regresión parcial y en tres de doce ratones tratados hubo una regresión tumoral completa. Los tumores que recibieron virus inactivado por UV continuaron creciendo sin mitigarse hasta que estos animales se sacrificaron en el día 11. Los ratones desnudos que no recibieron interferón y a los que se inyectó el virus vivo comenzaron a morir en el día 10 y sólo dos de seis permanecieron viables en el día 15. Por el contrario, todos los ratones desnudos, infectados, tratados con interferón, estuvieron protegidos de la toxicidad de VEV y permanecieron libres de síntomas durante más de 45 días.

Este ejemplo demuestra que una única inyección intratumoral de VEV vivo es eficaz contra los tumores. Además, los ratones desnudos, infectados, que llevan tumores, pueden salvarse de la toxicidad de VEV mediante la inyección de interferón.

## Ejemplo 19

*VEV infecta y elimina células de leucemia y de mieloma*

Las líneas celulares indicadas se infectaron con la cepa de VEV Indiana HR a una multiplicidad de infección de una unidad formadora de placa por célula. A las 24, 48 y 72 horas tras la infección (p.i.) se tomaron muestras de los cultivos infectados y se tiñeron directamente con yoduro de propidio siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Molecular Probes). Las muestras se analizaron entonces mediante citometría de flujo utilizando el programa FACSsort WinMDI Versión 2.7. En la tabla 8 se muestra el porcentaje de células muertas por cada tipo de célula leucémica para los tiempos indicados tras la infección.

## ES 2 320 239 T3

Este ejemplo muestra que VEV es viable para infectar y eliminar un conjunto diverso de tipos de leucemia. La célula K-562 se aísla de un paciente con leucemia mielógena crónica (CML) mientras que MOLT-4 es una leucemia de células T y SR y H929 son mielomas.

TABLA 8

Línea celular	24 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.
K-562 (CML)	15,38%	52,36%	N/D
MOLT-4 (leucemia de células T)	53,94%	48,80%	N/D
SR (mieloma)	32,10%	46,38%	N/D
H929 (mieloma)	10,73%	17,35%	64,41%

### Ejemplo 20

Las cepas del virus de la estomatitis vesicular (VEV) incluyendo el tipo natural Indiana y cinco mutantes de VEV atenuados demuestran citotoxicidad selectiva hacia células de carcinoma de próstata humano, en comparación con los fibroblastos humanos normales.

Las cepas del virus de la estomatitis vesicular, incluyendo el tipo natural Indiana y las cepas mutantes atenuadas I (TR1026), II (TR1026R), III (TP3), IV (TP6) y V (G31) se obtuvieron del Dr. Lauren Poliquin, Universidad de Quebec en Montreal. Cada una de estas cepas de virus se purificó en placa cinco veces antes de su uso en este experimento.

Se hicieron crecer células de carcinoma de próstata humano (LNCAP) y células humanas normales (fibroblasto de antebrazo OSF 7) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos hasta una densidad de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por pocillo. Se añadieron virus en diluciones de 10 veces que oscilaban desde  $5 \times 10^5$  ufp hasta 5 ufp. En cada placa se incluyeron pocillos control sin virus. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub>. Se cuantificó la citotoxicidad utilizando un ensayo colorimétrico MTS ((3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio, sal interna) (CellTiter 96 Aqueous, número de catálogo G 1 1 12, Promega Corporation, Madison WI 53711-5399), monitorizado a 490 nm, que detecta actividad de enzimas mitocondriales. La cantidad de muerte celular en los pocillos tratados con virus se determinó mediante la pérdida en la viabilidad en los pocillos tratados con virus con respecto a los pocillos no tratados. Los datos se representaron gráficamente como ufp/célula frente a porcentaje de muerte celular con respecto al control. Se calculó la CT50 (concentración tóxica al 50%) como la cantidad de virus en ufp/célula que produce una reducción del 50% en la cantidad de células viables. Los valores menores de CT50 reflejan el aumento de la sensibilidad de las células a los efectos líticos del virus. Se calculó el índice terapéutico *in vitro* para cada cepa de VEV como la razón de CT50 para las células OSF7, en comparación con la CT50 para las células LNCAP.

Los resultados se muestran en la tabla 9. El VEV Indiana de tipo natural y cada uno de los cinco mutantes demostraron un alto grado de citotoxicidad hacia las células de carcinoma de próstata humano, tal como se refleja en los bajos valores de CT50, todos inferiores a 0,01 ufp/célula. Las células de fibroblastos humanos normales fueron de uno a más de 3 órdenes de magnitud más resistentes a los efectos citotóxicos de todas las seis cepas de VEV. Los cinco mutantes tuvieron menos toxicidad sobre las células de fibroblastos OSF7 normales y tuvieron un mayor índice terapéutico *in vitro* que el VEV Indiana de tipo natural.

TABLA 9

*Resultados del ensayo de citotoxicidad para las cepas de VEV (Indiana de tipo natural y Mutantes del I al V) contra células de carcinoma de próstata y fibroblastos normales*

	Mutante I	Mutante II	Mutante III	Mutante IV	Mutante V	WI Indiana
Carcinoma de próstata LNCAP CT50 (ufp/célula)	0,0064	0,0048	0,0014	0,0006	0,0012	0,0017
Fibroblastos normales OSF7 CT50 (ufp/célula)	> 42	22	4,3	0,031	9,8	0,022
Índice terapéutico (CT50 OSF7 / CT50 LNCAPP)	> 6562	4583	3071	52	8167	13

## Ejemplo 21

*Producción de virus a partir de células tumorales y células normales infectadas con el tipo natural Indiana y varias cepas mutantes de VEV*

Se hicieron crecer células de carcinoma de colon HCT 116 y fibroblastos de antebrazo OSF 7 hasta la confluencia en placas de cultivo tisular de 35 mm. Se extrajo el medio y se añadieron los virus en un volumen de 30  $\mu$ l con una multiplicidad de infección de 0,1 ufp/célula para las células HCT 116 y de 1,5 ufp/célula para las células OSF 7. Tras un periodo de incubación de 1 hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió 1 ml de medio de cultivo tisular a las placas. Los resultados se muestran en las figuras 10A y B. En los puntos de tiempo indicados, se extrajeron muestras de 10  $\mu$ l de las placas. Se determinó el título de virus de estas muestras mediante un ensayo en placa.

Este ejemplo demuestra la rápida cinética de replicación de las cepas de VEV de tipo natural y mutante en las células de carcinoma de colon HCT 116. Las cuatro cepas mutantes de VEV tuvieron un crecimiento más rápido en las células tumorales HCT 116 que el VEV de tipo natural. Obsérvese que en los cultivos de células OSF-7 normales, se requiere una entrada diez veces mayor de virus para lograr similares cinéticas de replicación.

## Ejemplo 22

*Las células cancerígenas se eliminan rápidamente tras la infección por VEV (WT Indiana) y no están protegidas por el IFN- $\alpha$*

Monocapas de fibroblastos humanos primarios normales (AG 1522) y varias líneas de células tumorales se dejaron sin tratar o se pretrataron con IFN- $\alpha$  (100 unidades) y después se infectaron con VEV a una MOI de 0,1 ufp/ml. A incrementos de 12 horas se terminaron las infecciones mediante fijación celular y tinción para determinar la cinética de la muerte celular. Se dejaron crecer monocapas control (CNTL), no infectadas, durante el transcurso del experimento y, por tanto, se tiñeron más intensamente. Los resultados se muestran en la figura 11. LNCAP es un carcinoma de próstata humano; A2780 es un carcinoma epitelial de ovario humano, y Sk MEL3 es un melanoma humano.

Este ejemplo demuestra la rápida cinética de la muerte de la célula tumoral por el VEV Indiana incluso en presencia de interferón alfa. Aunque las células normales también mueren por el VEV, la cinética es más lenta y las células normales pueden protegerse completamente por el interferón alfa.



## Ejemplo 23

*El efecto citopático inducido por VEV es visible en células de melanoma humano pero no en células humanas primarias con y sin IFN- $\alpha$*

Cubreobjetos cubiertos con gelatina con células humanas normales y células SK-MEL3 no tratadas o pretratadas con IFN- $\alpha$  (100 U/ml) se infectaron con VEV WT Indiana a una MOI de 0,1 ufp/ml. Los resultados se muestran en la figura 12. Las células de melanoma humano (SK-MEL3) mostraron cpe a las 12 horas tras la infección incluso en presencia de interferón. A las 24 horas tras la infección, estas células cancerígenas habían muerto y se sacaron del cubreobjetos. Las células primarias humanas, incluyendo fibroblastos de prepucio (AG1522), células epiteliales de la superficie del ovario (HOSE) y células epiteliales de la próstata (PrEC) no mostraron CPE (efecto citopático) hasta las 36 horas en ausencia de interferón y estuvieron completamente protegidas en presencia de interferón más allá de las 72 horas tras la infección.

Este ejemplo demuestra que VEV Indiana puede destruir rápidamente células de melanoma incluso en presencia de interferón alfa, mientras que los fibroblastos normales y las células epiteliales son más lentos en morir y pueden resultar completamente protegidas por el interferón alfa.

## Ejemplo 24

*VEV elimina selectivamente células transformadas co-cultivadas con fibroblastos normales*

Se sembraron en placa números iguales de células 293T (células de riñón embrionarias humanas transformadas con el antígeno T grande y E1A de adenovirus) y fibroblastos de prepucio humanos normales sobre cubreobjetos recubiertos con gelatina y se infectaron (VEV WT Indiana) a una MOI de 0,1 tanto en presencia como en ausencia de interferón. Las células se fijaron a las 12 (no mostrado), 24 y 36 horas tras la infección. Las células fijadas se tiñeron con un anticuerpo anti-Tag y DAPI. Las células 293T teñidas de rojo murieron rápidamente tan sólo 12 horas tras la infección, independientemente del tratamiento con interferón, con aquellas pocas células restantes que mostraban núcleos condensados o fragmentados. Los fibroblastos normales mostraron núcleos alterados hacia las 36 horas tras la infección en ausencia de interferón, pero estuvieron protegidas del virus en presencia de interferón más allá de este punto de tiempo.

Este ejemplo demuestra que en un cultivo mixto de células normales y tumorales, VEV Indiana se replica preferentemente y elimina células tumorales. Las células normales en los co-cultivos infectados son más lentas en morir y pueden salvarse completamente mediante el tratamiento con interferón.

## Ejemplo 25

*Eficacia de una dosis intravenosa única de VEV mutante en el tratamiento de xenoinjertos de melanoma humano en ratones desnudos*

Se establecieron xenoinjertos de melanoma humano SK-Mel3 en ratones atímicos CD-1 de 5 - 6 semanas. En el día 0, los tumores o bien se dejaron sin tratar o se trataron por vía intravenosa con  $5 \times 10^9$  ufp de VEV mutante, tal como se indica. Los resultados se muestran en la figura 13.

Este ejemplo demuestra que los mutantes II y III pueden inhibir el crecimiento tumoral tras una única inyección intravenosa. Por tanto, no es necesario administrar el virus en el sitio del tumor para que sea eficaz en la inhibición del crecimiento del tumor. Además, los mutantes, aunque se están atenuando para su crecimiento en tejidos de ratón normales, todavía pueden seleccionar como diana células tumorales *in vivo*.

## Ejemplo 26

*Muerte selectiva de células AML co-cultivadas con médula ósea normal*

La línea celular OCI/AML3 independiente de factor de crecimiento se mezcló 1:9 con médula ósea normal y se infectó durante 24 horas con VEV WT Indiana. Después se sembraron en placa varias diluciones de células en metilcelulosa más y menos factores de crecimiento y se realizaron recuentos de colonias 14 días después. La tabla 10 muestra los datos para las placas que recibieron  $10^4$  células. El asterisco (\*) significa que no se detectaron colonias leucémicas en las placas sin factor de crecimiento incluso cuando se sembraron  $10^5$  células por placa.

Este ejemplo demuestra la muerte rápida y selectiva de células de leucemia en presencia de células madre óseas normales. Además, demuestra que la médula ósea no es un objetivo limitante de la dosis del tratamiento oncolítico con VEV, como ocurre con la mayor parte de otros tratamientos contra el cáncer convencionales.

TABLA 10

5	<b>Tipo de colonia</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>5,0</b>
	<b>Leucémica</b>	<b>172</b>	<b>0*</b>	<b>0*</b>
	<b>Neutrófilos</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>5</b>
10	<b>Mixta</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	<b>Monocitos</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>5</b>

15

## Ejemplo 27

*Secuencias de VEV*

20

25

El genoma de VEV contiene genes que codifican para las proteínas virales N, P, M, G y L. Se determinaron las secuencias de ADNc de los marcos de lectura abiertos (ORF) para estas proteínas del VEV resistente al calor (HR) de tipo natural y tres VEV mutantes (basándose en la secuenciación cinco veces para cada uno) y se compararon con las secuencias de GenBank con número de registro NC 001560 (derivado de las cepas de VEV de Colorado y San Juan). Los mutantes son M2 (TR 1026R), M3 (TP3) y M4 (TP6). Las secuencias de ácidos nucleicos se muestran en las figuras 14, 16, 18, 20 y 22. Las secuencias de aminoácidos deducidas correspondientes se muestran en las figuras 15, 17, 19, 21 y 23, respectivamente. Las diferencias se indican mediante letras destacadas. Las líneas de puntos representan secuenciación incompleta.

30

35

Algunas de las diferencias entre las secuencias de aminoácidos se muestran en la tabla 11 que utiliza la notación basada en el encabezamiento de la columna (es decir, para el encabezamiento de la columna “Diferencias entre GenBank y HR” la notación K155R significa que el aminoácido en la posición 155 es K en GenBank y R en HR). En los casos en que la secuencia HR todavía no está disponible, sólo pueden hacerse comparaciones entre GenBank y un mutante particular. M3\* indica una diferencia entre el mutante 3 y HR, pero en este caso, el aminoácido se corresponde con el depósito de GenBank en esa posición (es decir, el mutante 3 y la secuencia de GenBank coinciden en esta posición, mientras que HR es diferente).

40

Estos datos demuestran las múltiples diferencias en la secuencia entre la cepa HR y el depósito de GenBank (que se deriva principalmente de la cepa San Juan). También demuestra algunas de las diferencias entre los mutantes y la cepa HR de la que se derivan. Estas diferencias genéticas se corresponden con diferencias fenotípicas.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA 11

Gen	Diferencias entre GenBank y HR	Diferencias entre HR y los mutantes	Diferencias entre GenBank y el mutante 2	Diferencias entre GenBank y el mutante 4
N	D10A, K155R, N353S	A10D (M3*) Ninguna (M4)		
P	K50R, A76V, Q77P, E99D P110Q, S126L, S140L Y151H, M168I, E170K D237N	Ninguna (M2, M3 y M4)		
M	S32N, Y54H, N57H, T133A, I171V, I226V	M51R (M3) Ninguna (M4)		
G	H24Y, I57L, Q96H, V141A, Y172D, G132D H242R, S438T, L453F H487Y	Q26R, R242H, S431A (todos M3) E254G (M4)	A331V	
L	T367A, T689S, T2026I R2075K	Ninguna (M4)		I202L, K296R

La presente invención ha sido descrita con relación a modalidades preferidas. Sin embargo, será obvio para aquellas personas capacitadas en el arte que pueden hacerse una cantidad de variaciones y de modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se describe aquí.

#### Bibliografía

1. Stark, G. R., *et al.*, How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: pág. 227-64.
2. Jaramillo, M. L., N. Abraham, y J. C. Bell, The interferon system: a review with emphasis on the role of PKR in growth control. *Cancer Invest*, 1995. 13 (3): pág. 327-38.
3. Cuddihy, A. R., *et al.*, Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, 1999. 19 (4): pág. 2475-84.
4. Lee, S. B., *et al.*, The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology*, 1997. 231 (1): pág. 81-8.
5. Lee, S. B. y M. Esteban, The interferon-induced double-stranded RNA activated protein kinase induces apoptosis. *Virology*, 1994. 199 (2): pág. 491-6.
6. Gale, M. J., Jr., *et al.*, Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, 1997. 230 (2): pág. 217-27.

7. **McMillan**, N. A., *et al.*, HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology*, 1995. 213 (2): pág. 413-24.
8. **Kitajewski**, J., *et al.*, Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell*, 1986. 45 (2): pág. 195-200.
9. **Black**, T. L., G. N. **Barber**, y M. G. **Katze**, Degradation of the interferon induced 68,000-M (r) protein kinase by polio virus requires RNA. *J Virol*, 1993. 67 (2): pág. 791-800.
10. **Melville**, M. W., *et al.*, The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of P58IPK, the cellular inhibitor of PKR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(1): pág. 97-102.
11. **Swaminathan**, S., *et al.*, Simian Virus 40 Large-T Bypasses the Translational Block Imposed by the Phosphorylation of eIF-2alpha. *Virology*, 1996. 219(1): pág. 321-3.
12. **Der**, S. D., *et al.*, A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94 (7): pág. 3279-83.
13. **Meurs**, E. F., *et al.*, Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(1): pág. 232-6.
14. **Koromilas**, A. E., *et al.*, Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, 1992. 257 (5077): pág. 1685-9.
15. **Mundschau**, L. J. y D. V. Faller, Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem*, 1992. 267 (32): pág. 23092-8.
16. **Mundschau**, L. J. y D. V. Faller, Endogenous inhibitors of the dsRNA dependent eIF-2 alpha protein kinase PKR in normal and ras-transformed cells. *Biochimie*, 1994. 76 (8): pág. 792-800.
17. **Strong**, J. E., *et al.*, The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signalling pathway by reovirus. *Embo J*, 1998. 17(12): pág. 3351-62.
18. **Kumar**, K. U., S. P. Srivastava, y R. J. Kaufman, Double-stranded RNA activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Mol Cell Biol*, 1999. 19 (2): pág. 1116-25.
19. **Peralta**, R. C., *et al.*, Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer. *Int J Cancer*, 1998. 78 (5): pág. 600-5.
20. **Kirchhoff**, S., *et al.*, IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR. *Oncogene*, 1995. 11 (3): pág. 439-45.
21. **Beretta**, L., *et al.*, Expression of the protein kinase PKR in modulated by IRF-1 and is reduced in 5q-associated leukemias. *Oncogene*, 1996. 12 (7): pág. 1593-6.
22. **Lossos**, I. S., *et al.*, A novel translocation (1;2) (p34; p21-22) in acute myelomonoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998. 106 (1): pág. 78-9.
23. **Haines**, G. K. d., *et al.*, Expression of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (p68) in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1993. 119 (10): pág. 1142-7.
24. **Haines**, G. K., *et al.*, Correlation of the expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (p68) with differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1993. 63 (5): pág. 289-95.
25. **Shimada**, A., *et al.*, Aberrant expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase in hepatocytes of chronic hepatitis and differentiated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1998. 58 (19): pág. 4434-8.
26. **Wong**, L. H., *et al.*, Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem*, 1997. 272 (45): pág. 28779-85.
27. **Petricoin**, E., 3rd, *et al.*, Human cancer cell lines express a negative transcriptional regulator of the interferon regulatory factor family of DNA binding proteins. *Mol Cell Biol*, 1994. 14 (2): pág. 1477-86.
28. **Abril**, E., *et al.*, Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha-and gamma-interferon. *Tissue Antigens*, 1996. 47 (5): pág. 391-8.

29. **Abril, E., et al.**, Unresponsiveness to interferon associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol Immunother*, 1998. 47 (2): pág. 113-20.

30. **Sun, W. H., et al.**, Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood*, 1998. 91 (2): pág. 570-6.

31. **Chelbi-Alix, M. K., et al.**, Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol*, 1998. 72 (2): pág. 1043-51.

32. **Chelbi-Alix, M. K., et al.**, Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia*, 1995. 9 (12): pág. 2027-33.

33. **Stadler, M., et al.**, Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, 1995. 11 (12): pág. 2565-73.

34. **Koken, M. H., et al.**, Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94 (19): pág. 10255-60.

35. **Abraham, N., et al.**, Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, 1999. 274 (9): pág. 5953-62.

36. **Garcia-Sastre, A., et al.**, Influenza A virus lacking the NS 1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998. 252 (2): pág. 324-30.

# REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un virus para la fabricación de un medicamento para reducir la viabilidad de una célula tumoral en un individuo mamífero, en donde el virus s una cepa atenuada del virus de la estomatitis vesicular, en donde el virus está contenido en una célula infectada con el virus, y en donde la célula tumoral es un carcinoma.
2. El uso de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde la célula tumoral es un carcinoma de próstata.
- 10 3. El uso de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde la célula tumoral es un carcinoma de ovario.
4. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus es la cepa M1 del virus de estomatitis vesicular.
- 15 5. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus es la cepa M2 del virus de estomatitis vesicular.
6. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus es la cepa M3 del virus de estomatitis vesicular.
- 20 7. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus es la cepa M4 de estomatitis vesicular.
8. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus es la cepa M5 de estomatitis vesicular.
- 25 9. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, en donde la célula tumoral es una célula cancerosa hematopoyética, un melanoma, un sarcoma, un tumor neuroendocrino, un carcinoma de pulmón o un carcinoma de colon.
- 30 10. El uso de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde el individuo mamífero es un mamífero humano o un mamífero no humano.
- 35 11. El uso de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde la línea celular infectada con el virus es para la administración al individuo por medio de una ruta seleccionada entre intratumoral, intravenosa o intraperitoneal.
- 40 12. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen N que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína N que la secuencia de ADNc del gen N para las cepas M2, M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 14.
- 45 13. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen P que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína P que la secuencia de ADNc del gen P para las cepas M2, M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 16.
14. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen M que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína M que la secuencia de ADNc del gen M para las cepas M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 18.
- 50 15. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen G que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína G que la secuencia de ADNc del gen G para las cepas M2, M3 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 20.
- 55 16. El uso de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 3, en donde el virus tiene una secuencia de ácido nucleico del gen L que codifica para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína L que la secuencia de ADNc del gen L para las cepas M2 o M4 del virus de la estomatitis vesicular, como se muestra en la Figura 22.

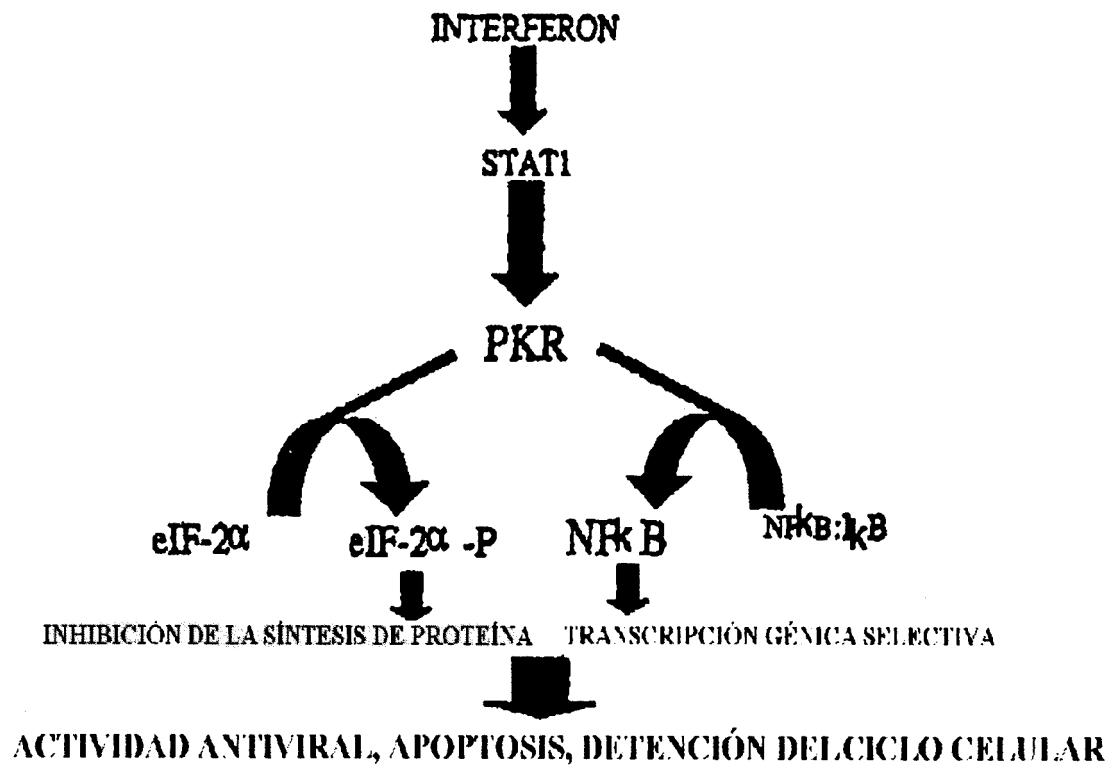
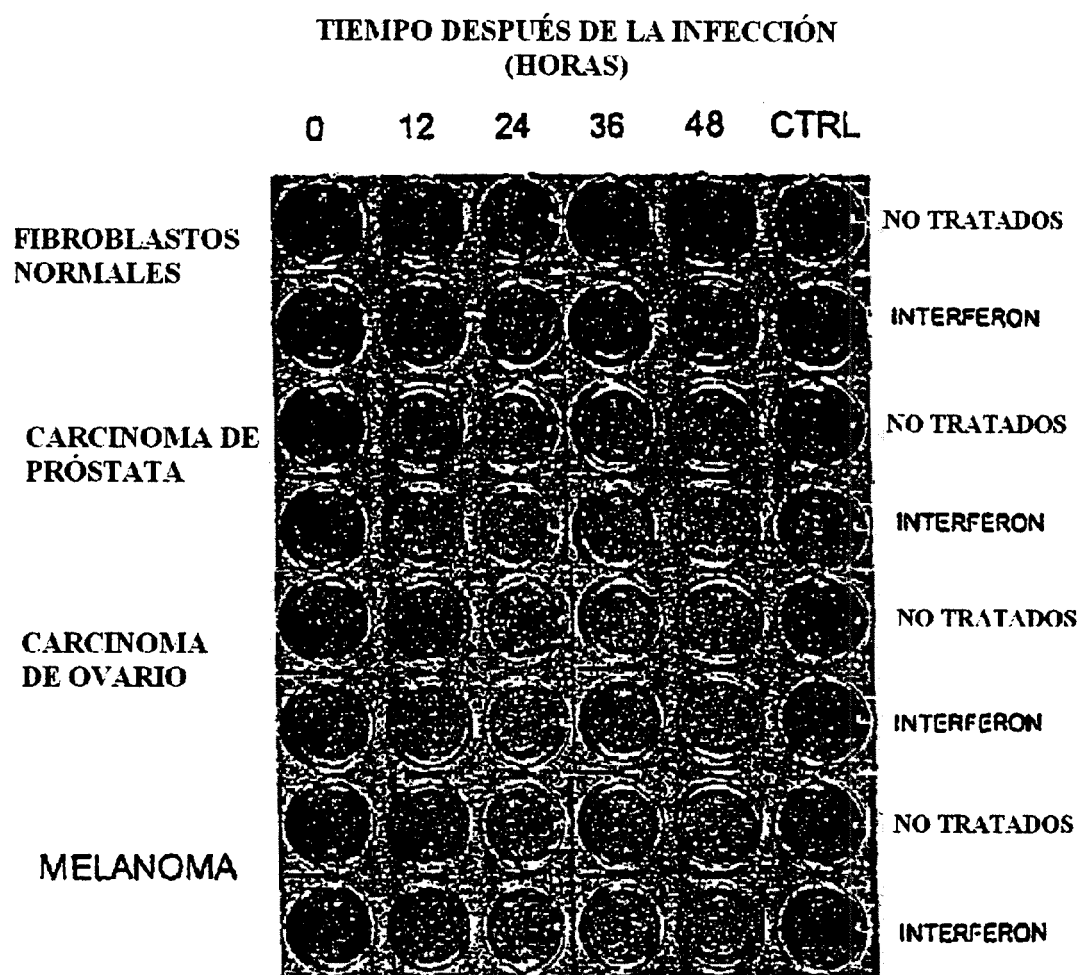


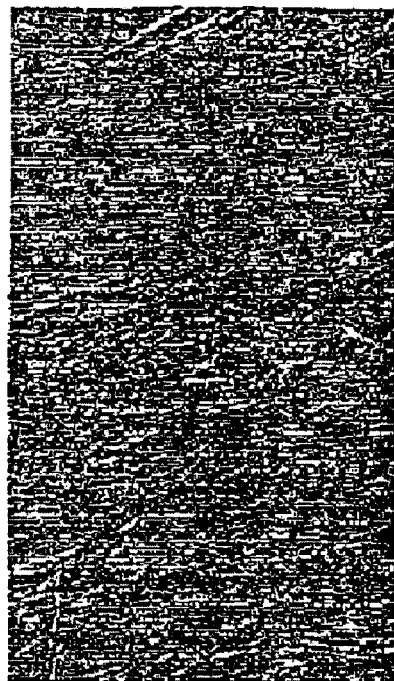
FIGURA 1



**FIGURA 2**



**INFECCIÓN CON VSV DE  
FIBROBLASTOS HUMANOS  
NORMALES**

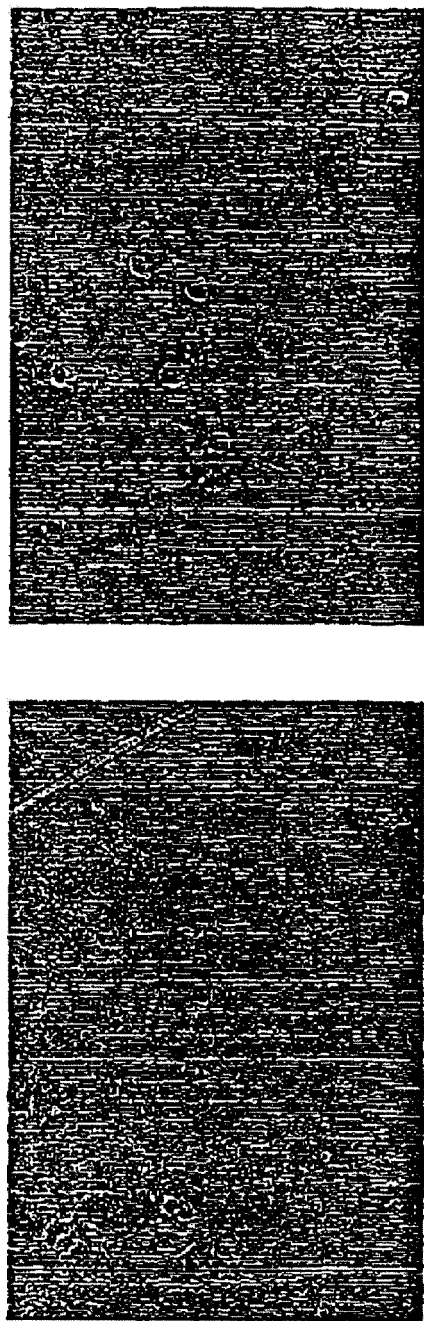


**COPIA INFECTADA**

**VSV MOI 1 PFU/18  
HORAS**

**FIGURA 3A**

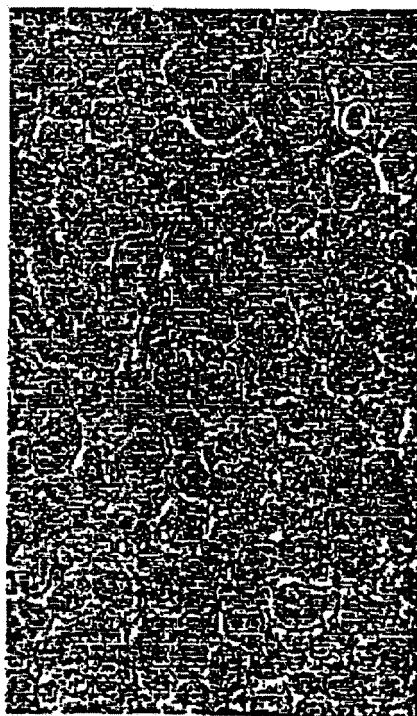
# INFECCIÓN CON VSV DE OVCAR433



COPIA INFECTADA VSV 0.1PFU/18 HORAS

FIGURA 3B

# INFECCIÓN CON VSV DE CÉLULAS KB



COPIA INFECTADA



VSV moi 1 PFU/18HORAS

FIGURA 3C

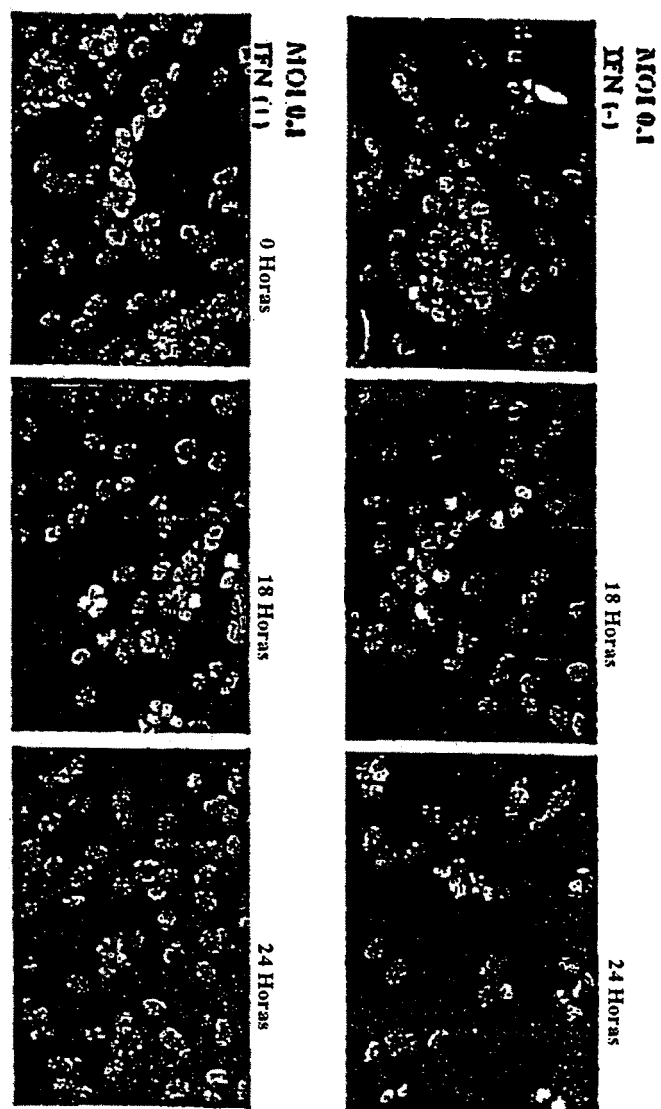
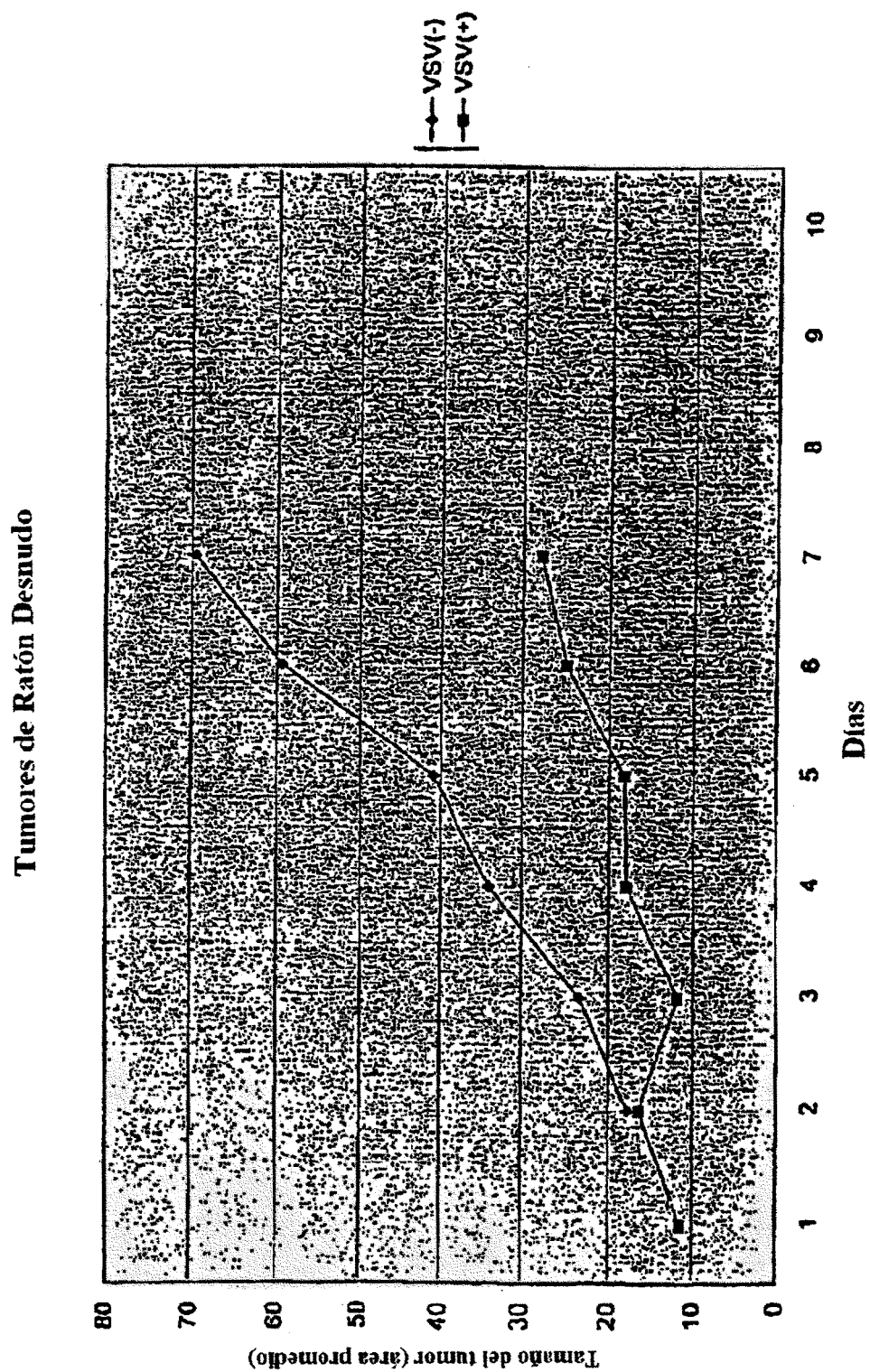
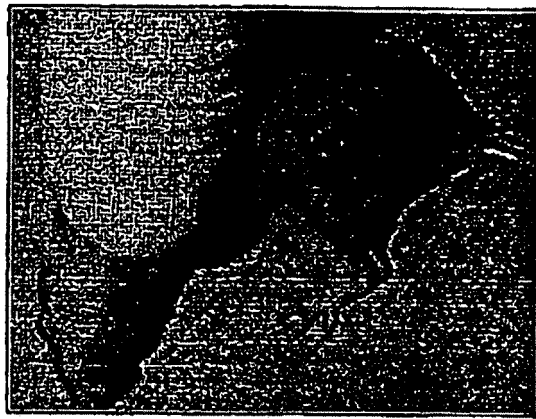


FIGURA 4



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

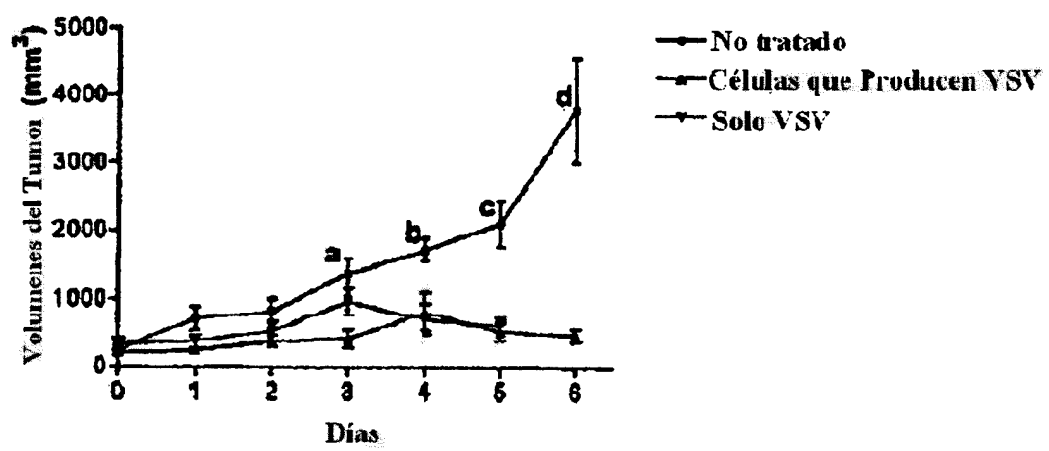
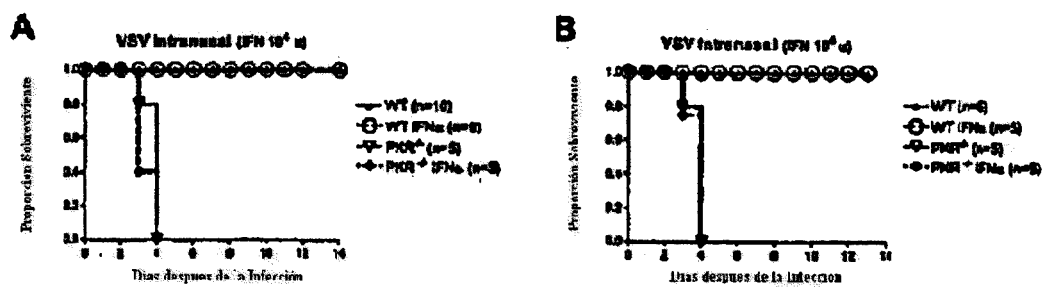


FIGURA 7



FIGURAS 8A Y 8B



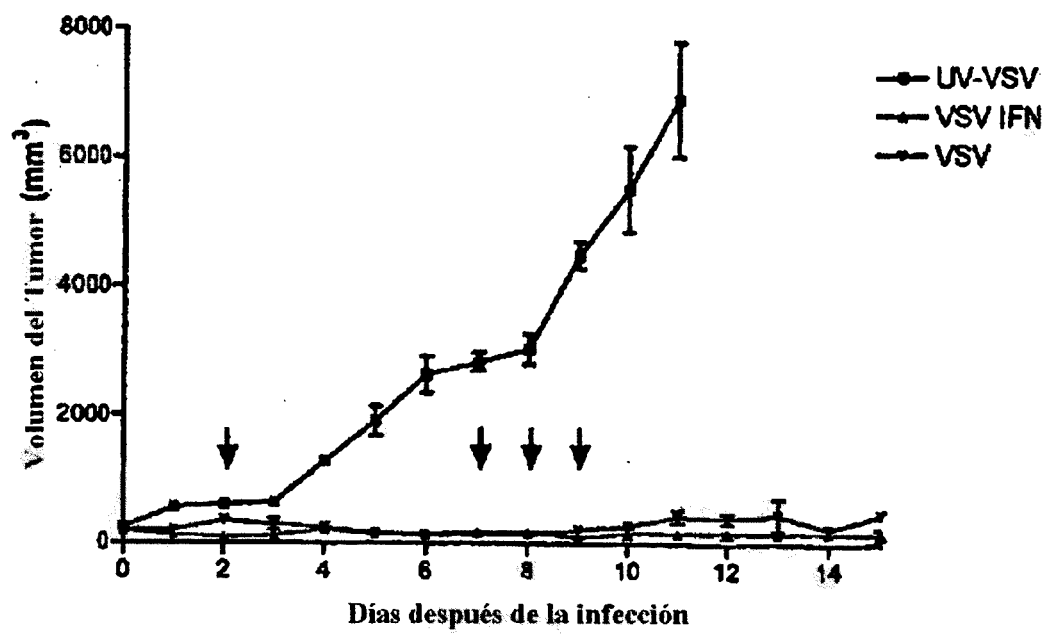
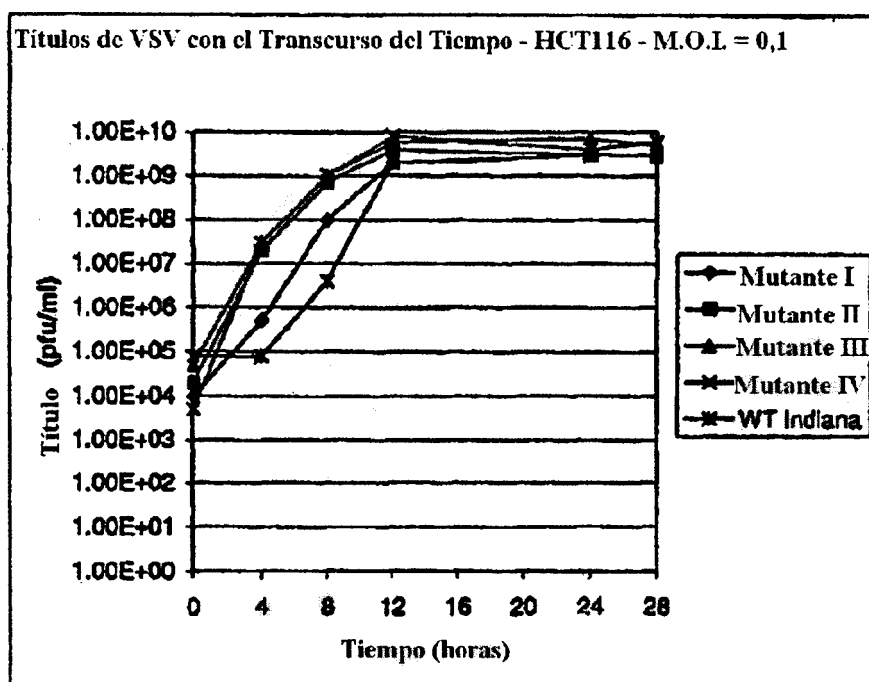
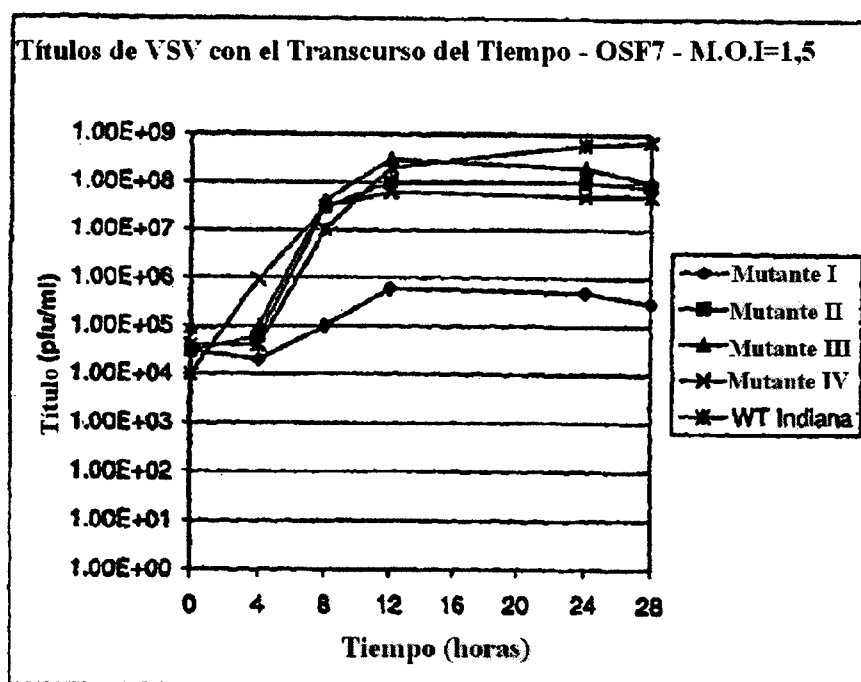


FIGURA 9



**FIGURA 10A**



**FIGURA 10B**

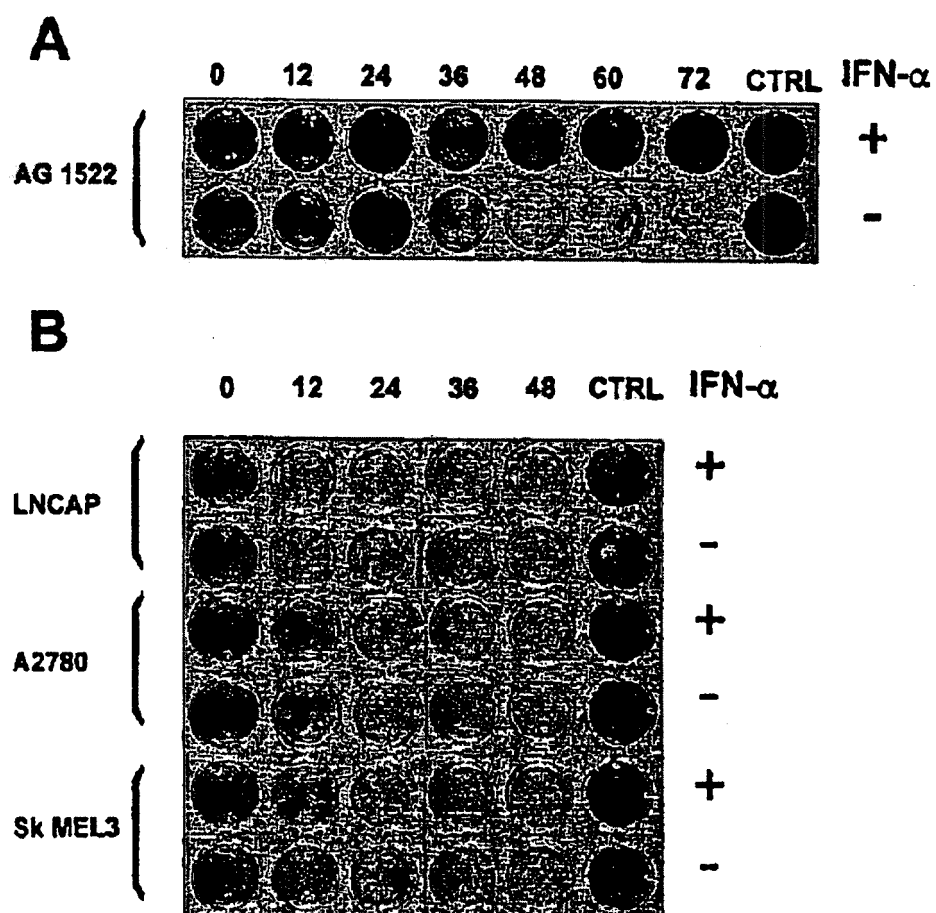
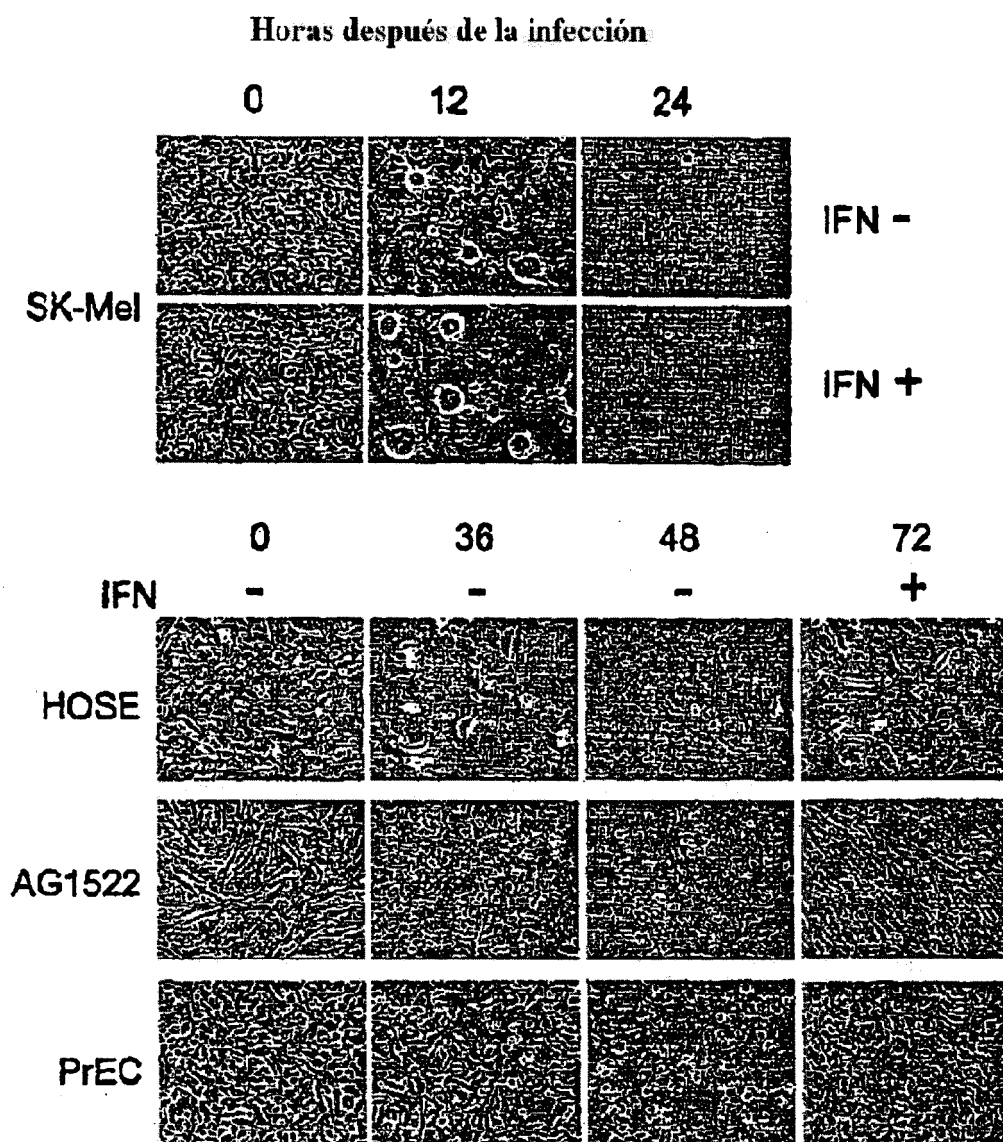


FIGURA 11



**FIGURA 12**

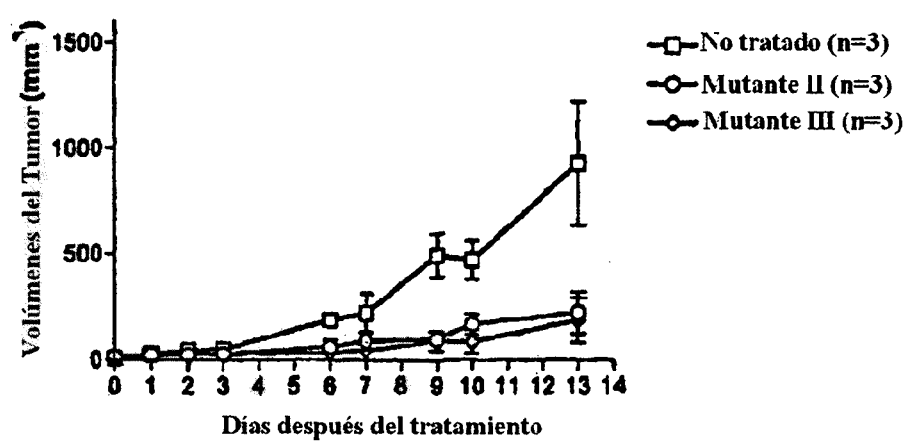


FIGURA 13

```

1
GenBank N nucl. 1 ACGTCGTTACAGTCACAGAGAAACATTGACAAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTCCCTGCA 60
HR N nucl. 1 ACGTCGTTACAGTCACAGAGAAATCTTCGCAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTCCCTGCA
M2 N nucl. 1 ACGTCGTTACAGTCACAGAGAAATCATTGACAAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTCCCTGCA
M3 N nucl. 1 ACGTCGTTACAGTCACAGAGAAATGATTGACAAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTCCCTGCA
M4 N nucl. 1 .....

61
GenBank N nucl. 1 AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAGGAGATTCTCTTT 120
HR N nucl. 1 AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAGGAGATTCTCTTT
M2 N nucl. 1 AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAGGAGATTCTCTTT
M3 N nucl. 1 AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAGGAGATTCTCTTT
M4 N nucl. 1 .....

121
GenBank N nucl. 1 TACATCAATACTACAAAAAGTTTGTTCAGATCTAAGAGGATATGCTTACCAAGGCCCTCAA 180
HR N nucl. 1 TACATCAATACTACAAAAAGTTTGTTCAGATCTAAGAGGATATGCTTACCAAGGCCCTCAA
M2 N nucl. 1 TACATCAATACTACAAAAAGTTTGTTCAGATCTAAGAGGATATGCTTACCAAGGCCCTCAA
M3 N nucl. 1 TACATCAATACTACAAAAAGTTTGTTCAGATCTAAGAGGATATGCTTACCAAGGCCCTCAA
M4 N nucl. 1 .....

181
GenBank N nucl. 1 TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTTGAAGGACATC 240
HR N nucl. 1 TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTTGAAGGACATC
M2 N nucl. 1 TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTTGAAGGACATC
M3 N nucl. 1 TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTTGAAGGACATC
M4 N nucl. 1 .....TCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTTGAAGGACATC

241
GenBank N nucl. 1 CCGGGTAAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTCGGATAAACAATCGGGAAAGCCAGGGAT 300
HR N nucl. 1 CCGGGTAAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTCGGATAAACAATCGGGAAAGCCAGGGAT
M2 N nucl. 1 CCGGGTAAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTCGGATAAACAATCGGGAAAGCCAGGGAT
M3 N nucl. 1 CCGGGTAAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTCGGATAAACAATCGGGAAAGCCAGGGAT
M4 N nucl. 1 CCGGGTAAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTCGGATAAACAATCGGGAAAGCCAGGGAT

301
GenBank N nucl. 1 ACAATCGGAATATTGACCTTGTATCCTTGAAGCCCTGGACGGGTGACTTCCAGATGGA 360
HR N nucl. 1 ACAATCGGAATATTGACCTTGTATCCTTGAAGCCCTGGACGGGTGACTTCCAGATGGA
M2 N nucl. 1 ACAATCGGAATATTGACCTTGTATCCTTGAAGCCCTGGACGGGTGACTTCCAGATGGA
M3 N nucl. 1 ACAATCGGAATATTGACCTTGTATCCTTGAAGCCCTGGACGGGTGACTTCCAGATGGA
M4 N nucl. 1 ACAATCGGAATATTGACCTTGTATCCTTGAAGCCCTGGACGGGTGACTTCCAGATGGA

361
GenBank N nucl. 1 GTATCGGATGCTTCCAGAACCCAGCCAGATGACAAATGGTTGCCCTTGTATCTACTTGGC 420
HR N nucl. 1 GTATCGGATGCTTCCAGAACCCAGCCAGATGACAAATGGTTGCCCTTGTATCTACTTGGC
M2 N nucl. 1 GTATCGGATGCTTCCAGAACCCAGCCAGATGACAAATGGTTGCCCTTGTATCTACTTGGC
M3 N nucl. 1 GTATCGGATGCTTCCAGAACCCAGCCAGATGACAAATGGTTGCCCTTGTATCTACTTGGC
M4 N nucl. 1 GTATCGGATGCTTCCAGAACCCAGCCAGATGACAAATGGTTGCCCTTGTATCTACTTGGC

421
GenBank N nucl. 1 TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGGCTCATGGATGGGCTG 480
HR N nucl. 1 TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGGCTCATGGATGGGCTG
M2 N nucl. 1 TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGGCTCATGGATGGGCTG
M3 N nucl. 1 TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGGCTCATGGATGGGCTG
M4 N nucl. 1 TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGGCTCATGGATGGGCTG

```

FIGURA 14-1

481  
 GenBank M nucl. ACAAATCAATGC AAAATGATCAATGAACAGTTTGAACCTCTTGTGCCAGAAAGGTGGTGAC 540  
 M1 M nucl. ACAAATCAATGC AAAATGATCAATGAACAGTTTGAACCTCTTGTGCCAGAAAGGTGGTGAC  
 M2 M nucl. ACAAATCAATGC AAAATGATCAATGAACAGTTTGAACCTCTTGTGCCAGAAAGGTGGTGAC  
 M3 M nucl. ACAAATCAATGC AAAATGATCAATGAACAGTTTGAACCTCTTGTGCCAGAAAGGTGGTGAC  
 M4 M nucl. ACAAATCAATGC AAAATGATCAATGAACAGTTTGAACCTCTTGTGCCAGAAAGGTGGTGAC

541  
 GenBank M nucl. ATTTTGTATGTGTGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTGCTGCAGTGGACATG 600  
 M1 M nucl. ATTTTGTATGTGTGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTGCTGCAGTGGACATG  
 M2 M nucl. ATTTTGTATGTGTGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTGCTGCAGTGGACATG  
 M3 M nucl. ATTTTGTATGTGTGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTGCTGCAGTGGACATG  
 M4 M nucl. ATTTTGTATGTGTGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTGCTGCAGTGGACATG

601  
 GenBank M nucl. TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCTCTGTTTCAGATAAGGAACTATTGTTTCC 660  
 M1 M nucl. TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCTCTGTTTCAGATAAGGAACTATTGTTTCC  
 M2 M nucl. TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCTCTGTTTCAGATAAGGAACTATTGTTTCC  
 M3 M nucl. TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCTCTGTTTCAGATAAGGAACTATTGTTTCC  
 M4 M nucl. TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCTCTGTTTCAGATAAGGAACTATTGTTTCC

661  
 GenBank M nucl. AGATTCAAAGATGTGTCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG 720  
 M1 M nucl. AGATTCAAAGATGTGTCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG  
 M2 M nucl. AGATTCAAAGATGTGTCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG  
 M3 M nucl. AGATTCAAAGATGTGTCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG  
 M4 M nucl. AGATTCAAAGATGTGTCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG

721  
 GenBank M nucl. TCTACAGAAAGATGTAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA 780  
 M1 M nucl. TCTACAGAAAGATGTAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA  
 M2 M nucl. TCTACAGAAAGATGTAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA  
 M3 M nucl. TCTACAGAAAGATGTAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA  
 M4 M nucl. TCTACAGAAAGATGTAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA

781  
 GenBank M nucl. ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTTCATACATGCTTATTGATGCGAC 840  
 M1 M nucl. ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTTCATACATGCTTATTGATGCGAC  
 M2 M nucl. ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTTCATACATGCTTATTGATGCGAC  
 M3 M nucl. ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTTCATACATGCTTATTGATGCGAC  
 M4 M nucl. ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTTCATACATGCTTATTGATGCGAC

841  
 GenBank M nucl. TTTCGATGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCGGTCAAAAACCTGCTCTCCACTTCTGG 900  
 M1 M nucl. TTTCGATGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCGGTCAAAAACCTGCTCTCCACTTCTGG  
 M2 M nucl. TTTCGATGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCGGTCAAAAACCTGCTCTCCACTTCTGG  
 M3 M nucl. TTTCGATGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCGGTCAAAAACCTGCTCTCCACTTCTGG  
 M4 M nucl. TTTCGATGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCGGTCAAAAACCTGCTCTCCACTTCTGG

FIGURA 14-2



```

GenBank N nucl. 901 960
HR N nucl. GGGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCCGACAGCCTGAT
M2 N nucl. GGGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCCGACAGCCTGAT
M3 N nucl. GGGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCCGACAGCCTGAT
M4 N nucl. GGGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCCGACAGCCTGAT
T

GenBank N nucl. 961 1020
HR N nucl. GACATTGAGTATACATCTCTTACTACAGCAGGTTTGTGTACGCTTATGCAGTAGGATCC
M2 N nucl. GACATTGAGTATACATCTCTTACTACAGCAGGTTTGTGTACGCTTATGCAGTAGGATCC
M3 N nucl. GACATTGAGTATACATCTCTTACTACAGCAGGTTTGTGTACGCTTATGCAGTAGGATCC
M4 N nucl. GACATTGAGTATACATCTCTTACTACAGCAGGTTTGTGTACGCTTATGCAGTAGGATCC

GenBank N nucl. 1021 1080
HR N nucl. TCTGCTGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTTGGAGATAGCAAATACACTCCAGATGATAGT
M2 N nucl. TCTGCTGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTTGGAGATAGCAAATACACTCCAGATGATAGT
M3 N nucl. TCTGCTGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTTGGAGATAGCAAATACACTCCAGATGATAGT
M4 N nucl. TCTGCTGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTTGGAGATAGCAAATACACTCCAGATGATAGT

GenBank N nucl. 1081 1160
HR N nucl. ACCCGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA
M2 N nucl. ACCCGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA
M3 N nucl. ACCCGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA
M4 N nucl. ACCCGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA

GenBank N nucl. 1161 1200
HR N nucl. TGGTTTGAAGATCAAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCGAAAAGAGCA
M2 N nucl. TGGTTTGAAGATCAAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCGAAAAGAGCA
M3 N nucl. TGGTTTGAAGATCAAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCGAAAAGAGCA
M4 N nucl. TGGTTTGAAGATCAAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCGAAAAGAGCA

GenBank N nucl. 1201 1260
HR N nucl. GTCATGTCACCTGCAAGGCTTAAGAGAGAAGACAATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAAATTT
M2 N nucl. GTCATGTCACCTGCAAGGCTTAAGAGAGAAGACAATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAAATTT
M3 N nucl. GTCATGTCACCTGCAAGGCTTAAGAGAGAAGACAATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAAATTT
M4 N nucl. GTCATGTCACCTGCAAGGCTTAAGAGAGAAGACAATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAAATTT

GenBank N nucl. 1261 1269
HR N nucl. GACAAATGA
M2 N nucl. GACAAATGA
M3 N nucl. GACAAATGA
M4 N nucl. GACAAATGA

```

FIGURA 14-3

GenBank	N a.a.	1	50
HR	N a.a.	MSVTVKRIIDNTVIVPKLPANEDPVEYPADYFRKSKETPLYINTTKSLSDLRGVVYQGLK	
M3	N a.a.	MSVTVKRIIDNTVIVPKLPANEDPVEYPADYFRKSKETPLYINTTKSLSDLRGVVYQGLK	
M4	N a.a.	.....	
GenBank	N a.a.	61	120
HR	N a.a.	SGNVSIIHVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG	
M3	N a.a.	SGNVSIIHVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG	
M4	N a.a.	....SIIHVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG	
GenBank	N a.a.	121	180
HR	N a.a.	VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD	
M3	N a.a.	VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD	
M4	N a.a.	VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD	
GenBank	N a.a.	181	240
HR	N a.a.	IFDVWGNDSNYTKIVAAMDVFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM	
M3	N a.a.	IFDVWGNDSNYTKIVAAMDVFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM	
M4	N a.a.	IFDVWGNDSNYTKIVAAMDVFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM	
GenBank	N a.a.	241	300
HR	N a.a.	STEDVTTWILNREVADEMVMMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKS PYSSVKNPAPHFW	
M3	N a.a.	STEDVTTWILNREVADEMVMMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKS PYSSVKNPAPHFW	
M4	N a.a.	STEDVTTWILNREVADEMVMMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKS PYSSVKNPAPHFW	
GenBank	N a.a.	301	360
HR	N a.a.	GQLTALLLRSTRARNARQPDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSEKTYTPDDS	
M3	N a.a.	GQLTALLLRSTRARNARQPDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSEKTYTPDDS	
M4	N a.a.	GQLTALLLRSTRARNARQPDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSEKTYTPDDS	
GenBank	N a.a.	361	420
HR	N a.a.	TGGLTTNAPPQGRDUEWLGWFEDQNRKPTPDMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF	
M3	N a.a.	TGGLTTNAPPQGRDUEWLGWFEDQNRKPTPDMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF	
M4	N a.a.	TGGLTTNAPPQGRDUEWLGWFEDQNRKPTPDMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF	
GenBank	N a.a.	421	423
HR	N a.a.	DK.	
M3	N a.a.	DK.	
M4	N a.a.	DK.	

FIGURA 15

```

1
GenBank P nucl. ATGGATAATCTCACAAAAGTTCTGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGATCAGGCG 60
HR P nucl. ATGGATAATCTCACAAAAGTTCTGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTAGATCAGGCG
M2 P nucl. ATGGATAATCTCACAAAAGTTCTGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTAGATCAGGCG
M3 P nucl. ATGGATAATCTCACAAAAGTTCTGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTAGATCAGGCG
M4 P nucl. ATGGATAATCTCACAAAAGTTCTGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTAGATCAGGCG

51
GenBank P nucl. GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATCAGTTGTTTC 120
HR P nucl. GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATCAGTTGTTTC
M2 P nucl. GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATCAGTTGTTTC
M3 P nucl. GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATCAGTTGTTTC
M4 P nucl. GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATCAGTTGTTTC

121
GenBank P nucl. CAAGAGGAGGAGTGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTCAGGCAGCAGATGATTCT 180
HR P nucl. CAAGAGGAGGAGTGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTCAGGCAGCAGATGATTCT
M2 P nucl. CAAGAGGAGGAGTGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTCAGGCAGCAGATGATTCT
M3 P nucl. CAAGAGGAGGAGTGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTCAGGCAGCAGATGATTCT
M4 P nucl. CAAGAGGAGGAGTGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTCAGGCAGCAGATGATTCT

181
GenBank P nucl. GACACAGAATCTGAACCCAGAAATTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGACGATCCGAA 240
HR P nucl. GACACAGAATCTGAACCCAGAAATTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGTACAGATCCGGAA
M2 P nucl. GACACAGAATCTGAACCCAGAAATTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGTACAGATCCGGAA
M3 P nucl. GACACAGAATCTGAACCCAGAAATTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGTACAGATCCGGAA
M4 P nucl. GACACAGAATCTGAACCCAGAAATTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGTACAGATCCGGAA

241
GenBank P nucl. GCTGAGCAAGTGAAGGCTTTATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTG 300
HR P nucl. GCTGAGCAAGTGAAGGCTTTATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTG
M2 P nucl. GCTGAGCAAGTGAAGGCTTTATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTG
M3 P nucl. GCTGAGCAAGTGAAGGCTTTATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTG
M4 P nucl. GCTGAGCAAGTGAAGGCTTTATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTG

301
GenBank P nucl. GATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG 360
HR P nucl. GATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG
M2 P nucl. GATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG
M3 P nucl. GATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG
M4 P nucl. GATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG

361
GenBank P nucl. ACCTTACGGTTGACATCCAGAGGGTTTAAGTGGAGAGCAGAAATCCAGTGGCTTTTG 420
HR P nucl. ACCTTACGGTTGACATCCAGAGGGTTTAAGTGGAGAGCAGAAATCCAGTGGCTTTTG
M2 P nucl. ACCTTACGGTTGACATCCAGAGGGTTTAAGTGGAGAGCAGAAATCCAGTGGCTTTTG
M3 P nucl. ACCTTACGGTTGACATCCAGAGGGTTTAAGTGGAGAGCAGAAATCCAGTGGCTTTTG
M4 P nucl. ACCTTACGGTTGACATCCAGAGGGTTTAAGTGGAGAGCAGAAATCCAGTGGCTTTTG

```

FIGURA 16-1

```

421                                     480
GenBank P nucl. ACGATTAAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAACTCTGGCAGAGTGCACATTGAA
HR P nucl. ACGATTAAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAACTCTGGCAGAGTGCACATTGAA
M2 P nucl. ACGATTAAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAACTCTGGCAGAGTGCACATTGAA
M3 P nucl. ACGATTAAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAACTCTGGCAGAGTGCACATTGAA
M4 P nucl. ACGATTAAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAACTCTGGCAGAGTGCACATTGAA

481                                     540
GenBank P nucl. GCATCGGGAGAAGGGGTCATCAATAAGGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC
HR P nucl. GCATCGGGAGAAGGGGTCATCAATAAGGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC
M2 P nucl. GCATCGGGAGAAGGGGTCATCAATAAGGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC
M3 P nucl. GCATCGGGAGAAGGGGTCATCAATAAGGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC
M4 P nucl. GCATCGGGAGAAGGGGTCATCAATAAGGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC

541                                     600
GenBank P nucl. ACTCCAGTGTGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTTGGTCTCTC
HR P nucl. ACTCCAGTGTGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTTGGTCTCTC
M2 P nucl. ACTCCAGTGTGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTTGGTCTCTC
M3 P nucl. ACTCCAGTGTGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTTGGTCTCTC
M4 P nucl. ACTCCAGTGTGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTTGGTCTCTC

601                                     660
GenBank P nucl. TCAAAGACATCCATGACTTTCCAACCCAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCC
HR P nucl. TCAAAGACATCCATGACTTTCCAACCCAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCC
M2 P nucl. TCAAAGACATCCATGACTTTCCAACCCAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCC
M3 P nucl. TCAAAGACATCCATGACTTTCCAACCCAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCC
M4 P nucl. TCAAAGACATCCATGACTTTCCAACCCAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCC

661                                     720
GenBank P nucl. TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAAATTCATCTCTGTGCGAGGTACGGACGAATG
HR P nucl. TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAAATTCATCTCTGTGCGAGGTACGGACGAATG
M2 P nucl. TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAAATTCATCTCTGTGCGAGGTACGGACGAATG
M3 P nucl. TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAAATTCATCTCTGTGCGAGGTACGGACGAATG
M4 P nucl. TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAAATTCATCTCTGTGCGAGGTACGGACGAATG

721                                     780
GenBank P nucl. TCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGTACAAAAAGTTGTACAAATCAGGCCGAGA
HR P nucl. TCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGTACAAAAAGTTGTACAAATCAGGCCGAGA
M2 P nucl. TCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGTACAAAAAGTTGTACAAATCAGGCCGAGA
M3 P nucl. TCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGTACAAAAAGTTGTACAAATCAGGCCGAGA
M4 P nucl. TCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGTACAAAAAGTTGTACAAATCAGGCCGAGA

781                                     798
GenBank P nucl. GTCAAATATTCTCTGTAG
HR P nucl. GTCAAATATTCTCTGTAG
M2 P nucl. GTCAAATATTCTCTGTAG
M3 P nucl. GTCAAATATTCTCTGTAG
M4 P nucl. GTCAAATATTCTCTGTAG

```

FIGURA 16-2

	1	60
GenBank P a.a.	MDNLTxvREYLKsYSRLDQAVGEIDEIEAQRaEKsNYELFQEDGVEEHTrPSYFQAADDS	
HR P a.a.	MDNLTxvREYLKsYSRLDQAVGEIDEIEAQRaEKsNYELFQEDGVEEHTrPSYFQAADDS	
M2 P a.a.	MDNLTxvREYLKsYSRLDQAVGEIDEIEAQRaEKsNYELFQEDGVEEHTrPSYFQAADDS	
M3 P a.a.	MDNLTxvREYLKsYSRLDQAVGEIDEIEAQRaEKsNYELFQEDGVEEHTrPSYFQAADDS	
M4 P a.a.	MDNLTxvREYLKsYSRLDQAVGEIDEIEAQRaEKsNYELFQEDGVEEHTrPSYFQAADDS	
	61	120
GenBank P a.a.	DTESEPEIEDNQGLYVFDPEAEQVEGFIQGPLDDYADEVDVVFTSDWKQPELESDEHGK	
HR P a.a.	DTESEPEIEDNQGLYVFDPEAEQVEGFIQGPLDDYADEVDVVFTSDWKQPELESDEHGK	
M2 P a.a.	DTESEPEIEDNQGLYVFDPEAEQVEGFIQGPLDDYADEVDVVFTSDWKQPELESDEHGK	
M3 P a.a.	DTESEPEIEDNQGLYVFDPEAEQVEGFIQGPLDDYADEVDVVFTSDWKQPELESDEHGK	
M4 P a.a.	DTESEPEIEDNQGLYVFDPEAEQVEGFIQGPLDDYADEVDVVFTSDWKQPELESDEHGK	
	121	180
GenBank P a.a.	TLRLTLPEGLSGEQKsQWLLTIKAVVQsAKHWNLAECTFEASGEGVITIKRQITPDVYKv	
HR P a.a.	TLRLTLPEGLSGEQKsQWLLTIKAVVQsAKHWNLAECTFEASGEGVITIKRQITPDVYKv	
M2 P a.a.	TLRLTLPEGLSGEQKsQWLLTIKAVVQsAKHWNLAECTFEASGEGVITIKRQITPDVYKv	
M3 P a.a.	TLRLTLPEGLSGEQKsQWLLTIKAVVQsAKHWNLAECTFEASGEGVITIKRQITPDVYKv	
M4 P a.a.	TLRLTLPEGLSGEQKsQWLLTIKAVVQsAKHWNLAECTFEASGEGVITIKRQITPDVYKv	
	181	240
GenBank P a.a.	TPVMNTHPSQSEAVSDVNSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSRGEFISVGGNGRM	
HR P a.a.	TPVMNTHPSQSEAVSDVNSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSRGEFISVGGNGRM	
M2 P a.a.	TPVMNTHPSQ.....	
M3 P a.a.	TPVMNTHPSQSEAVSDVNSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSRGEFISVGGNGRM	
M4 P a.a.	TPVMNTHPSQSEAVSDVNSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSRGEFISVGGNGRM	
	241	266
GenBank P a.a.	SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL	
HR P a.a.	SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL	
M2 P a.a.	.....	
M3 P a.a.	SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL	
M4 P a.a.	SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL	

FIGURA 17

```

GenBank M nucl. 1 60
HR M nucl. ATGAGTTCCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA
M3 M nucl. ATGAGTTCCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA
M4 M nucl. ATGAGTTCCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA

GenBank M nucl. 61 120
HR M nucl. GGGATCGCACCACCCCTTATGAAGAGGACACTAATGAGTATGCTCCGAGCGCTCCA
M3 M nucl. GGGATCGCACCACCCCTTATGAAGAGGACACTAATGAGTATGCTCCGAGCGCTCCA
M4 M nucl. GGGATCGCACCACCCCTTATGAAGAGGACACTAATGAGTATGCTCCGAGCGCTCCA

GenBank M nucl. 121 180
HR M nucl. ATTGACAAATCCTATTTTGGAGTTGACGAGATGGACACTATGATCCGATCAATTAAGA
M3 M nucl. ATTGACAAATCCTATTTTGGAGTTGACGAGATGGACACTATGATCCGATCAATTAAGA
M4 M nucl. ATTGACAAATCCTATTTTGGAGTTGACGAGATGGACACTATGATCCGATCAATTAAGA

GenBank M nucl. 181 240
HR M nucl. TATGAGAAATTCCTTTTACAGTGAATAATGACGGTTAGATCTAATCGTCCGTTTCAAGA
M3 M nucl. TATGAGAAATTCCTTTTACAGTGAATAATGACGGTTAGATCTAATCGTCCGTTTCAAGA
M4 M nucl. TATGAGAAATTCCTTTTACAGTGAATAATGACGGTTAGATCTAATCGTCCGTTTCAAGA

GenBank M nucl. 241 300
HR M nucl. TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCATTTGGGATCAGATGTACATCGGAATGGCAGGG
M3 M nucl. TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCATTTGGGATCAGATGTACATCGGAATGGCAGGG
M4 M nucl. TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCATTTGGGATCAGATGTACATCGGAATGGCAGGG

GenBank M nucl. 301 360
HR M nucl. AAACGTCCCTTCTACAAATCTTGGCTTTTGGGTTCTTCTAATCTAAAGGCCACTCCA
M3 M nucl. AAACGTCCCTTCTACAAATCTTGGCTTTTGGGTTCTTCTAATCTAAAGGCCACTCCA
M4 M nucl. AAACGTCCCTTCTACAAATCTTGGCTTTTGGGTTCTTCTAATCTAAAGGCCACTCCA

GenBank M nucl. 361 420
HR M nucl. GCGGTATTTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACCTCACTGGAAGGCAGGGCTTAT
M3 M nucl. GCGGTATTTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACCTCACTGGAAGGCAGGGCTTAT
M4 M nucl. GCGGTATTTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACCTCACTGGAAGGCAGGGCTTAT

GenBank M nucl. 421 480
HR M nucl. TTGCCACACAGATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACTTCAGAAGA
M3 M nucl. TTGCCACACAGATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACTTCAGAAGA
M4 M nucl. TTGCCACACAGATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACTTCAGAAGA

GenBank M nucl. 481 540
HR M nucl. CCATTCAATATAGGTCTTTACAAGGGAACGGTTGAGCTCACAATGACCATCTACGATGAT
M3 M nucl. CCATTCAATATAGGTCTTTACAAGGGAACGGTTGAGCTCACAATGACCATCTACGATGAT
M4 M nucl. CCATTCAATATAGGTCTTTACAAGGGAACGGTTGAGCTCACAATGACCATCTACGATGAT

```

FIGURA 18-1

```

541
GenBank M nucl. GAGTCACTGGAAGCAGCTCCTATGATCTGGGATCATTCAATTCTTCCAAATTTTCTGAT 600
HR M nucl. GAGTCACTGGAAGCAGCTCCTATGATCTGGGATCATTCAATTCTTCCAAATTTTCTGAT
M3 M nucl. GAGTCACTGGAAGCAGCTCCTATGATCTGGGATCATTCAATTCTTCCAAATTTTCTGAT
M4 M nucl. GAGTCACTGGAAGCAGCTCCTATGATCTGGGATCATTCAATTCTTCCAAATTTTCTGAT

501
GenBank M nucl. TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTTGG 660
HR M nucl. TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTTGG
M3 M nucl. TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTTGG
M4 M nucl. TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTTGG

561
GenBank M nucl. GTCCTGGATTCTTCAGCCACTTCAAATGA 690
HR M nucl. GTCCTGGATTCTTCAGCCACTTCAAATGA
M3 M nucl. GTCCTGGATTCTTCAGCCACTTCAAATGA
M4 M nucl. GTCCTGGATTCTTCAGCCACTTCAAATGA

```

FIGURA 18-2

```

GenBank M a . a .      1                               60
HR M a . a .      MSSLKILGLKGKGGKSKKLGIAPPPYEEDTMEYAPSAPIDKSYFGVDEMOTDHPQLR
M4 M a . a .      MSSLKILGLKGKGGKSKKLGIAPPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDEMOTDHPQLR
M3 M a . a .      MSSLKILGLKGKGGKSKKLGIAPPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDEDTDHPQLR

GenBank M a . a .      61                               120
HR M a . a .      YEKFFFTVKMTVRSNRPFRITYSDVAAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP
M4 M a . a .      YEKFFFTVKMTVRSNRPFRITYSDVAAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP
M3 M a . a .      YEKFFFTVKMTVRSNRPFRITYSDVAAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP

GenBank M a . a .      121                              180
HR M a . a .      AVLADQGGQPEYHCEGRAYLFHRMGKTPPMLNVPEHFRPFFNIGLYKGTIELTMTIYDD
M4 M a . a .      AVLADQGGQPEYHCEGRAYLFHRMGKTPPMLNVPEHFRPFFNIGLYKGTVELTMTIYDD
M3 M a . a .      AVLADQGGQPEYHCEGRAYLFHRMGKTPPMLNVPEHFRPFFNIGLYKGTVELTMTIYDD

GenBank M a . a .      181                              230
HR M a . a .      ESLEAAPMIWDHFNSSKFSDFREKALMFGLIVEKKASGAWVLDSEVSHFK.
M4 M a . a .      ESLEAAPMIWDHFNSSKFSDFREKALMFGLIVEKKASGAWVLDSEVSHFK.
M3 M a . a .      ESLEAAPMIWDHFNSSKFSDFREKALMFGLIVEKKASGAWVLDSEVSHFK.

```

FIGURA 19



```

1                               60
GenBank G nucl. ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCTTTTATTTCATGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATA
HR G nucl. ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCTTTTATTTCATCGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATA
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCTTTTATTTCATCGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATA
M4 G nucl. ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCTTTTATTTCATCGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATA

61                               120
GenBank G nucl. GTTTTTCCTACACCAAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTTCAATTACCATTATTGC
HR G nucl. GTTTTTCCTACACCAAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTTCAATTACCATTATTGC
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. GTTTTTCCTACACCAAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTTCAATTACCATTATTGC
M4 G nucl. GTTTTTCCTACACCAAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTTCAATTACCATTATTGC

121                               180
GenBank G nucl. CCGTCAAGCTCAGATTAAATGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAA
HR G nucl. CCGTCAAGCTCAGATTAAATGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAA
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. CCGTCAAGCTCAGATTAAATGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAA
M4 G nucl. CCGTCAAGCTCAGATTAAATGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAGTCAAA

181                               240
GenBank G nucl. ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCTATGCTTCCAAATGG
HR G nucl. ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCTATGCTTCCAAATGG
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCTATGCTTCCAAATGG
M4 G nucl. ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCTATGCTTCCAAATGG

241                               300
GenBank G nucl. GTCACTACTTGTGATTTCGGCTGGTACGGACCGAAGTATATAACACATCCATCCGATCC
HR G nucl. GTCACTACTTGTGATTTCGGCTGGTACGGACCGAAGTATATAACACATCCATCCGATCC
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. GTCACTACTTGTGATTTCGGCTGGTACGGACCGAAGTATATAACACATCCATCCGATCC
M4 G nucl. GTCACTACTTGTGATTTCGGCTGGTACGGACCGAAGTATATAACACATCCATCCGATCC

301                               360
GenBank G nucl. TTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAGTGG
HR G nucl. TTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAGTGG
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. TTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAGTGG
M4 G nucl. TTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAGTGG

361                               420
GenBank G nucl. CTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCTGAAGCA
HR G nucl. CTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCTGAAGCA
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. CTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCTGAAGCA
M4 G nucl. CTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCTGAAGCA

421                               480
GenBank G nucl. GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGTTGATGAATACACAGSAGAAATGGGTT
HR G nucl. GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGTTGATGAATACACAGSAGAAATGGGTT
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGTTGATGAATACACAGSAGAAATGGGTT
M4 G nucl. GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGTTGATGAATACACAGSAGAAATGGGTT

```

FIGURA 20-1

```

481                                     540
GenBank G nucl. GATTCACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATACATATGCCCCACTGTCCATAACTCC
HR G nucl. GATTCACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATGACATATGCCCCACTGTCCATAACTCC
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. GATTCACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATGACATATGCCCCACTGTCCATAACTCC
M4 G nucl. GATTCACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATGACATATGCCCCACTGTCCATAACTCC

541                                     600
GenBank G nucl. ACAACCTGGCATTCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG
HR G nucl. ACAACCTGGCATTCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. ACAACCTGGCATTCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG
M4 G nucl. ACAACCTGGCATTCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG

601                                     660
GenBank G nucl. GACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGAAAGGAGGGGCACAGGG
HR G nucl. GACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGGCACAGGG
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. GACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGGCACAGGG
M4 G nucl. GACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGGCACAGGG

661                                     720
GenBank G nucl. TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGCAAGGCCCTGCAAAATGCAGTACTGC
HR G nucl. TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGCAAGGCCCTGCAAAATGCAGTACTGC
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGCAAGGCCCTGCAAAATGCAGTACTGC
M4 G nucl. TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGCAAGGCCCTGCAAAATGCAGTACTGC

721                                     780
GenBank G nucl. AAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGCTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC
HR G nucl. AAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGCTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. AAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGCTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC
M4 G nucl. AAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGCTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC

781                                     840
GenBank G nucl. TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG
HR G nucl. TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG
M2 G nucl. ....
M3 G nucl. TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG
M4 G nucl. TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG

841                                     900
GenBank G nucl. ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGC
HR G nucl. ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGC
M2 G nucl. ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGC
M3 G nucl. ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGC
M4 G nucl. ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGC

```

FIGURA 20-2

```

901.                                     950
GenBank G nucl. CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTAT
HR G nucl. ....
M2 G nucl. CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTAT
M3 G nucl. CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTAT
M4 G nucl. ....

961                                     1020
GenBank G nucl. CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAA
HR G nucl. ....
M2 G nucl. CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAA
M3 G nucl. CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAA
M4 G nucl. ....

1021                                     1080
GenBank G nucl. TACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCTCTCAAGAATGGTC
HR G nucl. ....
M2 G nucl. TACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCTCTCAAGAATGGTC
M3 G nucl. TACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCTCTCAAGAATGGTC
M4 G nucl. TACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCTCTCAAGAATGGTC

1081                                     1140
GenBank G nucl. GGAATGATCAGTGGAACTACCAAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCTCCATATGAA
HR G nucl. ....
M2 G nucl. GGAATGATCAGTGGAACTACCAAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCTCCATATGAA
M3 G nucl. GGAATGATCAGTGGAACTACCAAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCTCCATATGAA
M4 G nucl. GGAATGATCAGTGGAACTACCAAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCTCCATATGAA

1141                                     1200
GenBank G nucl. GACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTA
HR G nucl. ....
M2 G nucl. GACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTA
M3 G nucl. GACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTA
M4 G nucl. GACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTA

1201                                     1260
GenBank G nucl. TATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTG
HR G nucl. ....
M2 G nucl. TATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTG
M3 G nucl. TATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTG
M4 G nucl. TATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTG

1261                                     1320
GenBank G nucl. TTGGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCACTTCCTGATGATGAGACTTTATT
HR G nucl. ....
M2 G nucl. TTGGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCACTTCCTGATGATGAGACTTTATT
M3 G nucl. TTGGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCACTTCCTGATGATGAGACTTTATT
M4 G nucl. TTGGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCACTTCCTGATGATGAGACTTTATT

```

FIGURA 20-3

```

1321                                     1380
GenBank G nucl. TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGT
HR G nucl. ....
M2 G nucl. TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGT
M3 G nucl. TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGT
M4 G nucl. TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGT

1381                                     1440
GenBank G nucl. TGGAAAGAGCTCTATTGCCTCTTTTTCCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTG
HR G nucl. ....
M2 G nucl. TGGAAAGAGCTCTATTGCCTCTTTTTCCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTG
M3 G nucl. TGGAAAGAGCTCTATTGCCTCTTTTTCCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTG
M4 G nucl. TGGAAAGAGCTCTATTGCCTCTTTTTCCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTG

1441                                     1500
GenBank G nucl. GTTCTCCGAGTTGGTATGATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT
HR G nucl. ....
M2 G nucl. GTTCTCCGAGTTGGTATTTATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT
M3 G nucl. GTTCTCCGAGTTGGTATTTATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT
M4 G nucl. GTTCTCCGAGTTGGTATTTATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT

1501                                     1536
GenBank G nucl. TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGAAGTAA
HR G nucl. ....
M2 G nucl. TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGAAGTAA
M3 G nucl. TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGAAGTAA
M4 G nucl. TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGAAGTAA

```

FIGURA 20-4

```

1                               60
GenBank G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCFTTIVFPYNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWNHNDLIGTALQVK
HR G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCFTTIVFPYNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWNHNDLIGTALQVK
M2 G a.a. ....
M3 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCFTTIVFPYNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWNHNDLIGTALQVK
M4 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCFTTIVFPYNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWNHNDLIGTALQVK

61                               120
GenBank G a.a. MPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW
HR G a.a. MPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW
M2 G a.a. ....
M3 G a.a. MPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW
M4 G a.a. MPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW

121                               180
GenBank G a.a. LNPGFPPQSCGYATVTDAEAAIVQVTPHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNDICPTVHNS
HR G a.a. LNPGFPPQSCGYATVTDAEAAIVQVTPHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNDICPTVHNS
M2 G a.a. ....
M3 G a.a. LNPGFPPQSCGYATVTDAEAAIVQVTPHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNDICPTVHNS
M4 G a.a. LNPGFPPQSCGYATVTDAEAAIVQVTPHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNDICPTVHNS

181                               240
GenBank G a.a. TTWHS DYKVKGLCD SNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYPAYETGDKACKM QYC
HR G a.a. TTWHS DYKVKGLCD SNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYPAYETGDKACKM QYC
M2 G a.a. ....
M3 G a.a. TTWHS DYKVKGLCD SNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYPAYETGDKACKM QYC
M4 G a.a. TTWHS DYKVKGLCD SNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYPAYETGDKACKM QYC

241                               300
GenBank G a.a. KHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLC
HR G a.a. KHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLC
M2 G a.a. .... PSQTSVDVSLIQDVERILDYSLC
M3 G a.a. KHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLC
M4 G a.a. KHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLC

301                               360
GenBank G a.a. QETWSKIRAGLPISPVDSLAPKNFGTGPAFTIINGTLKYPETRYIRVDIAAPILSRMV
HR G a.a. QETWSKIRAGLPISPVDSLAPKNFGTGPAFTIINGTLKYPETRYIRVDIAAPILSRMV
M2 G a.a. QETWSKIRAGLPISPVDSLAPKNFGTGPAFTIINGTLKYPETRYIRVDIAAPILSRMV
M3 G a.a. QETWSKIRAGLPISPVDSLAPKNFGTGPAFTIINGTLKYPETRYIRVDIAAPILSRMV
M4 G a.a. YFETRYIRVDIAAPILSRMV

361                               420
GenBank G a.a. GMISGTTTERELWDDNAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLYMHIGHGMLDSDLHLSSKAQV
HR G a.a. GMISGTTTERELWDDNAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLYMHIGHGMLDSDLHLSSKAQV
M2 G a.a. GMISGTTTERELWDDNAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLYMHIGHGMLDSDLHLSSKAQV
M3 G a.a. GMISGTTTERELWDDNAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLYMHIGHGMLDSDLHLSSKAQV
M4 G a.a. GMISGTTTERELWDDNAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLYMHIGHGMLDSDLHLSSKAQV

```

FIGURA 21-1

		421		480
GenBank	G a.a.	FEHPHIQDAASQLPDE	ELFFGDTGLSKNPIELVEGWFS	SWKSSIASFFFIIGLIIGLFL
HR	G a.a.	.....	.....	.....
M2	G a.a.	FEHPHIQDAASQLPDE	TLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFS	SWKSSIASFFFIIGLIIGLPL
M3	G a.a.	FEHPHIQDAASQLPDE	TLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFS	SWKSSIASFFFIIGLIIGLFL
M4	G a.a.	FEHPHIQDAASQLPDE	TLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFS	SWKSSIASFFFIIGLIIGLFL
		481		512
GenBank	G a.a.	VLRVGI	LCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK	
HR	G a.a.	.....	.....	
M2	G a.a.	VLRVGIVL	CIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK	
M3	G a.a.	VLRVGIVL	CIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK	
M4	G a.a.	VLRVGIVL	CIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK	

FIGURA 21-2

GenBank L nucl.	1	60
HR L nucl.	ATGGAAGTCCACGATTTTGAGACCGACGAGTTCAATGATTTCATGAAGATGACTATGCC	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	ATGGAAGTCCACGATTTTGAGACCGACGAGTTCAATGATTTCATGAAGATGACTATGCC	
GenBank L nucl.	61	120
HR L nucl.	ACAAGAGAATTCTGGAATCCCGATGAGCGCATGACGTACTTGAATCATGCTGATTACAAT	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	ACAAGAGAATTCTGGAATCCCGATGAGCGCATGACGTACTTGAATCATGCTGATTACAAT	
GenBank L nucl.	121	180
HR L nucl.	TTGAATTCTCCTCTAATTAGTGATGATATTGACAATTTGATCAGGAAATTCATTTCTCTT	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TTGAATTCTCCTCTAATTAGTGATGATATTGACAATTTGATCAGGAAATTCATTTCTCTT	
GenBank L nucl.	181	240
HR L nucl.	CCGATTCCTCGATGTGGGATAGTAAGAACTGGGATGGAGTTCTTGAGATGTTAACATCA	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	CCGATTCCTCGATGTGGGATAGTAAGAACTGGGATGGAGTTCTTGAGATGTTAACATCA	
GenBank L nucl.	241	300
HR L nucl.	TGTCAAGCCAATCCCATCTCAACATCTCAGATGCATAAATGGATGGGAAGTTGGTTAATG	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TGTCAAGCCAATCCCATCTCAACATCTCAGATGCATAAATGGATGGGAAGTTGGTTAATG	
GenBank L nucl.	301	360
HR L nucl.	TCTGATAATCATGATGCCAGTCAAGGGTATAGTTTTTTACATGAAGTGGACAAAGAGGCA	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TCTGATAATCATGATGCCAGTCAAGGGTATAGTTTTTTACATGAAGTGGACAAAGAGGCA	
GenBank L nucl.	361	420
HR L nucl.	GAAATAACATTGACGTGGTGGAGACCTTCATCCGCGGCTGGGGCAACAAACCAATTGAA	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	GAAATAACATTGACGTGGTGGAGACCTTCATCCGCGGCTGGGGCAACAAACCAATTGAA	
GenBank L nucl.	421	480
HR L nucl.	TACATCAAAAAGGAAAGATGGACTGACTCATTCAAAATTCCTCGCTTATTTGTGTCAAAG	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TACATCAAAAAGGAAAGATGGACTGACTCATTCAAAATTCCTCGCTTATTTGTGTCAAAG	
GenBank L nucl.	481	540
HR L nucl.	TTTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTCTGAGGTGGAATTGCTC	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TTTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTCTGAGGTGGAATTGCTC	

FIGURA 22-1

	541	600
GenBank L nucl.	AACTTGGCGAGGACTTTTCAAAGGCAAAGTCAGAAGAAGTTCTCATGGAACGAACATATGC	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	AACTTGGCGAOGACTTTTCAAAGGCAAAGTCAGAAGAAGTTCTCATGGAACGAACATATGC	
	601	660
GenBank L nucl.	AGCGTTAGGGTTCCCAGCTTGGGTCTACTTTTATTTTCAGAAGGATGGGCTTACTTCAAG	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	AGCGTTAGGGTTCCCAGCTTGGGTCTACTTTTATTTTCAGAAGGATGGGCTTACTTCAAG	
	661	720
GenBank L nucl.	AAACTTGATATTCTAATGGACCGAAACTTTCTGTTAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGG	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	AAACTTGATATTCTAATGGACCGAAACTTTCTGTTAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGG	
	721	780
GenBank L nucl.	AGGATGCAAAACGGTGCTATCCATGGTATGTAGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAGAC	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	AGGATGCAAAACGGTGCTATCCATGGTATGTAGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAGAC	
	781	840
GenBank L nucl.	ATCTTCTCCCTTCTAAATATCTACAGAATTGGAGATAAAATGTGGAGAGGCAGGGAAAT	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	ATCTTCTCCCTTCTAAATATCTACAGAATTGGAGATAAAATGTGGAGAGGCAGGGAAAT	
	841	900
GenBank L nucl.	TTTCTTATGACTTGATTAAAAATGGTGGAAACCGATATGCAACTTGAAGCTGATGAAATTA	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TTTCTTATGACTTGATTAAAAATGGTGGAAACCGATATGCAACTTGAAGCTGATGAAATTA	
	901	960
GenBank L nucl.	GCAAGAGAATCAAGGCCCTTTAGTCCCACAATTCCCTCATTTTGAAAATCATATCAAGACT	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	GCAAGAGAATCAAGGCCCTTTAGTCCCACAATTCCCTCATTTTGAAAATCATATCAAGACT	
	961	1020
GenBank L nucl.	TCTGTTGATGAAGGGGCAAAAATTGACCGAGGTATAAGATTCCCTCCATGATCAGATAATG	
HR L nucl.	.....	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	TCTGTTGATGAAGGGGCAAAAATTGACCGAGGTATAAGATTCCCTCCATGATCAGATAATG	

FIGURA 22-2



GenBank L nucl.	1021	1080
HR L nucl.	AGTGTGAAAAACAGTGGATCTCACACTGGTGATTATGGATCGTTCAGACATTGGGGTCAT	
M2 L nucl.	.....CATTGGGGTCAT	
M4 L nucl.	AGTGTGAAAAACAGTGGATCTCACACTGGTGATTATGGATCGTTCAGACATTGGGGTCAT	
GenBank L nucl.	1081	1140
HR L nucl.	CCTTTTATAGATTATTACCTGGACTAGAAAAATTACATTCCCAAGTAACCATGAAGAAA	
M2 L nucl.	CCTTTTATAGATTATTACGCTGGCTAGAAAAATTACATTCCCAAGTACCATGAAGAAA	
M4 L nucl.	CCTTTTATAGATTATTACGCTGGACTAGAAAAATTACATTCCCAAGTAACCATGAAGAAA	
GenBank L nucl.	1141	1200
HR L nucl.	GATATTGATGTGTCATATGCAAAAGCACTTGCAAGTGATTAGCTCGGATTGTTCTATTT	
M2 L nucl.	GATATTGATGTGTCATATGCAAAAGCACTTGCAAGTGATTAGCTCGGATTGTTCTATTT	
M4 L nucl.	GATATTGATGTGTCATATGCAAAAGCACTTGCAAGTGATTAGCTCGGATTGTTCTATTT	
GenBank L nucl.	1201	1260
HR L nucl.	CAACAGTTCAATGATCATAAAAAAGTGGTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCAT	
M2 L nucl.	CAACAGTTCAATGATCATAAAAAAGTGGTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCAT	
M4 L nucl.	CAACAGTTCAATGATCATAAAAAAGTGGTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCAT	
GenBank L nucl.	1261	1320
HR L nucl.	CCCTTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTT	
M2 L nucl.	CCCTTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTT	
M4 L nucl.	CCCTTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTT	
GenBank L nucl.	1321	1380
HR L nucl.	GGAGATAAATGGCATGAACTTCCGCTGATTAAATGTTTTGAAATACCCGACTTACTAGAC	
M2 L nucl.	GGAGATAAATGGCATGAACTTCCGCTGATTAAATGTTTTGAAATACCCGACTTACTAGAC	
M4 L nucl.	GGAGATAAATGGCATGAACTTCCGCTGATTAAATGTTTTGAAATACCCGACTTACTAGAC	
GenBank L nucl.	1381	1440
HR L nucl.	CCATCGATAATATACCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTCAGAGGTGTTGAACAT	
M2 L nucl.	CCATCGATAATATACCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTCAGAGGTGTTGAACAT	
M4 L nucl.	CCATCGATAATATACCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTCAGAGGTGTTGAACAT	
GenBank L nucl.	1441	1500
HR L nucl.	GTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC	
M2 L nucl.	GTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC	
M4 L nucl.	GTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC	

FIGURA 22-3

GenBank L nucl.	1501	1560
HR L nucl.	ACAAAGGCTACCAATTGGAAAGAATTTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGAT	
M2 L nucl.	ACAAAGGCTACCAATTGGAAAGAATTTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGAT	
M4 L nucl.	ACAAAGGCTACCAATTGGAAAGAATTTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGAT	
GenBank L nucl.	1561	1620
HR L nucl.	GATGATCTAATTATTGGTCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAAGTTGGCAGGTAGATTT	
M2 L nucl.	GATGATCTAATTATTGGTCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAAGTTGGCAGGTAGATTT	
M4 L nucl.	GATGATCTAATTATTGGTCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAAGTTGGCAGGTAGATTT	
GenBank L nucl.	1621	1680
HR L nucl.	TTCTCCCTAATGTCTTGGAAATTGCGAGAATACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAG	
M2 L nucl.	TTCTCCCTAATGTCTTGGAAATTGCGAGAATACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAG	
M4 L nucl.	TTCTCCCTAATGTCTTGGAAATTGCGAGAATACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAG	
GenBank L nucl.	1681	1740
HR L nucl.	ACTCATTTCGTCCCTATGTTTAAAGGCTGACAATGGCGGACGATCTAACTGCAGTCATT	
M2 L nucl.	ACTCATTTCGTCCCTATGTTTAAAGGCTGACAATGGCGGACGATCTAACTGCAGTCATT	
M4 L nucl.	ACTCATTTCGTCCCTATGTTTAAAGGCTGACAATGGCGGACGATCTAACTGCAGTCATT	
GenBank L nucl.	1741	1800
HR L nucl.	AAAAAGATGTTAGATTCTCATCCGGCCAGGATTGAAGTCATATGAGGCAATTTGCATA	
M2 L nucl.	AAAAAGATGTTAGATTCTCATCCGGCCAGGATTGAAGTCATATGAGGCAATTTGCATA	
M4 L nucl.	AAAAAGATGTTAGATTCTCATCCGGCCAGGATTGAAGTCATATGAGGCAATTTGCATA	
GenBank L nucl.	1801	1860
HR L nucl.	GCCAATCACATTGATTACGAAAAATGGAATAACCACCAAAGGAAGTTATCAAACGGCCCA	
M2 L nucl.	GCCAATCACATTGATTACGAAAAATGGAATAACCACCAAAGGAAGTTATCAAACGGCCCA	
M4 L nucl.	GCCAATCACATTGATTACGAAAAATGGAATAACCACCAAAGGAAGTTATCAAACGGCCCA	
GenBank L nucl.	1861	1920
HR L nucl.	GTGTTCCGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAATCATGAA	
M2 L nucl.	GTGTTCCGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAATCATGAA	
M4 L nucl.	GTGTTCCGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAATCATGAA	
GenBank L nucl.	1921	1980
HR L nucl.	TTTTTTGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAAC	
M2 L nucl.	TTTTTTGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAAC	
M4 L nucl.	TTTTTTGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAAC	
GenBank L nucl.	1981	2040
HR L nucl.	AACACACTGATCAATTCAACCTCCAACGAGTTTGTGGCAAGGACAAGAGGGTGGACTG	
M2 L nucl.	AACACACTGATCAATTCAACCTCCAACGAGTTTGTGGCAAGGACAAGAGGGTGGACTG	
M4 L nucl.	AACACACTGATCAATTCAACCTCCAACGAGTTTGTGGCAAGGACAAGAGGGTGGACTG	

FIGURA 22-4

GenBank L nucl.	2041	2100
HR L nucl.	GAAGGTCTACGGCAAAAAGGATGGATATCTCTCAATCTACTGGTTATTCAAAGAGAGGCT	
M2 L nucl.	GAAGGTCTACGGCAAAAAGGATGGAGTATCTCTCAATCTACTGGTTATTCAAAGAGAGGCT	
M4 L nucl.	GAAGGTCTACGGCAAAAAGGATGGAGTATCTCTCAATCTACTGGTTATTCAAAGAGAGGCT	
GenBank L nucl.	2101	2160
HR L nucl.	AAAATCAGAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAAGGTGATAATCAAGTTATTTCACACA	
M2 L nucl.	AAAATCAGAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAAGGTGATAATCAAGTTATTTCACACA	
M4 L nucl.	AAAATCAGAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAAGGTGATAATCAAGTTATTTCACACA	
GenBank L nucl.	2161	2220
HR L nucl.	CAGTATAAAACGAAGAAATCGAGAAACGTTGTAGAAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATG	
M2 L nucl.	CAGTATAAAACGAAGAAATCGAGAAACGTTGTAGAAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATG	
M4 L nucl.	CAGTATAAAACGAAGAAATCGAGAAACGTTGTAGAAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATG	
GenBank L nucl.	2221	2280
HR L nucl.	GTTTCTAATAATGAGAAATTTATGACTGCAATCAAAATAGGGACAGGGAAGTTAGGACTT	
M2 L nucl.	GTTTCTAATAATGAGAAATTTATGACTGCAATCAAAATAGGGACAGGGAAGTTAGGACTT	
M4 L nucl.	GTTTCTAATAATGAGAAATTTATGACTGCAATCAAAATAGGGACAGGGAAGTTAGGACTT	
GenBank L nucl.	2281	2340
HR L nucl.	TTGATAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAATTATGGAAAAATACCG	
M2 L nucl.	TTGATAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAATTATGGAAAAATACCG	
M4 L nucl.	TTGATAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAATTATGGAAAAATACCG	
GenBank L nucl.	2341	2400
HR L nucl.	ATTTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTGTGTC	
M2 L nucl.	ATTTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTGTGTC	
M4 L nucl.	ATTTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTGTGTC	
GenBank L nucl.	2401	2460
HR L nucl.	ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTTCCACAAATGCTCTC	
M2 L nucl.	ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTTCCACAAATGCTCTC	
M4 L nucl.	ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTTCCACAAATGCTCTC	
GenBank L nucl.	2461	2520
HR L nucl.	ACCGTAGCTCATTTTGCTGAGAACCCCAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTTGGG	
M2 L nucl.	ACCGTAGCTCATTTTGCTGAGAACCCCAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTTGGG	
M4 L nucl.	ACCGTAGCTCATTTTGCTGAGAACCCCAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTTGGG	
GenBank L nucl.	2521	2580
HR L nucl.	ACATTGCTAGACTCTTGTGTGATGATGCATGATCCTGCTCTTCGTCAATCATTTGTATGAA	
M2 L nucl.	ACATTGCTAGACTCTTGTGTGATGATGCATGATCCTGCTCTTCGTCAATCATTTGTATGAA	
M4 L nucl.	ACATTGCTAGACTCTTGTGTGATGATGCATGATCCTGCTCTTCGTCAATCATTTGTATGAA	

FIGURA 22-5

GenBank L nucl.	2581	2640
HR L nucl.	GTTCAAGATAAGATACCGGGCTTGACACAGTTCTACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTG	
M2 L nucl.	GTTCAAGATAAGATACCGGGCTTGACACAGTTCTACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTG	
M4 L nucl.	.....	
	GTTCAAGATAAGATACCGGGCTTGACACAGTTCTACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTG	
GenBank L nucl.	2641	2700
HR L nucl.	GACCCTTCCATTGGAGGAGTGTCCGGCATGTCTTTGTCCAGGTTTTTGATTAGAGCCTTC	
M2 L nucl.	GACCCTTCCATTGGAGGAGTGTCCGGCATGTCTTTGTCCAGGTTTTTGATTAGAGCCTTC	
M4 L nucl.	.....	
	GACCCTTCCATTGGAGGAGTGTCCGGCATGTCTTTGTCCAGGTTTTTGATTAGAGCCTTC	
GenBank L nucl.	2701	2760
HR L nucl.	CCAGATCCCGTAACAGAAAGTCTCTCATTTCTGGAGATTTCATCCATGTACATGCTCGAAGT	
M2 L nucl.	CCAGATCCCGTAACAGAAAGTCTCTCATTTCTGGAGATTTCATCCATGTACATGCTCGAAGT	
M4 L nucl.	.....	
	CCAGATCCCGTAACAGAAAGTCTCTCATTTCTGGAGATTTCATCCATGTACATGCTCGAAGT	
GenBank L nucl.	2761	2820
HR L nucl.	GAGCATCTGAAGGAGATGAGTGCAGTATTTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTTCGAATA	
M2 L nucl.	GAGCATCTGAAGGAGATGAGTGCAGTATTTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTTCGAATA	
M4 L nucl.	.....	
	GAGCATCTGAAGGAGATGAGTGCAGTATTTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTTCGAATA	
GenBank L nucl.	2821	2880
HR L nucl.	ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGT	
M2 L nucl.	ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGT	
M4 L nucl.	.....	
	ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGT	
GenBank L nucl.	2881	2940
HR L nucl.	CCAGCGAACTTGTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAATCAAGACAAACCATC	
M2 L nucl.	CCAGCGAACTTGTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAATCAAGACAAACCATC	
M4 L nucl.	.....	
	CCAGCGAACTTGTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAATCAAGACAAACCATC	
GenBank L nucl.	2941	3000
HR L nucl.	AGGAACCAGGTGATTAAAGGATGCAACCATATATTTGTATCATGAAGAGGATCGGCTCAGA	
M2 L nucl.	AGGAACCAGGTGATTAAAGGATGCAACCATATATTTGTATCATGAAGAGGATCGGCTCAGA	
M4 L nucl.	.....	
	AGGAACCAGGTGATTAAAGGATGCAACCATATATTTGTATCATGAAGAGGATCGGCTCAGA	
GenBank L nucl.	3001	3060
HR L nucl.	AGTTTCTTATGGTCAATAAATCCTCTGTTCCTTAGATTTTTAAGTGAATTCAAATCAGGC	
M2 L nucl.	AGTTTCTTATGGTCAATAAATCCTCTGTTCCTTAGATTTTTAAGTGAATTCAAATCAGGC	
M4 L nucl.	.....	
	AGTTTCTTATGGTCAATAAATCCTCTGTTCCTTAGATTTTTAAGTGAATTCAAATCAGGC	
GenBank L nucl.	3061	3120
HR L nucl.	ACTTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTTCAAATTTCTCGTACTATTCCG	
M2 L nucl.	ACTTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTTCAAATTTCTCGTACTATTCCG	
M4 L nucl.	.....	
	ACTTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTTCAAATTTCTCGTACTATTCCG	

FIGURA 22-6

GenBank L nucl.	3121	3180
HR L nucl.	AACTCCTTTAAGAAAAAGTATCATAGGGAATTGGATGATTGATTGTGAGGAGTGAGGTA	
M2 L nucl.	AACTCCTTTAAGAAAAAGTATCATAGGGAATTGGATGATTGATTGTGAGGAGTGAGGTA	
M4 L nucl.	AACTCCTTTAAGAAAAAGTATCATAGGGAATTGGATGATTGATTGTGAGGAGTGAGGTA	
GenBank L nucl.	3181	3240
HR L nucl.	TCCTCTTTGACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGGATCATGTAAAAATGTGGACA	
M2 L nucl.	TCCTCTTTGACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGGATCATGTAAAAATGTGGACA	
M4 L nucl.	TCCTCTTTGACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGGATCATGTAAAAATGTGGACA	
GenBank L nucl.	3241	3300
HR L nucl.	TGTTTCAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATACAAATCCTGGGGCCGTACAGTTATTGGG	
M2 L nucl.	TGTTTCAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATACAAATCCTGGGGCCGTACAGTTATTGGG	
M4 L nucl.	TGTTTCAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATACAAATCCTGGGGCCGTACAGTTATTGGG	
GenBank L nucl.	3301	3360
HR L nucl.	ACAACCTGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGT	
M2 L nucl.	ACAACCTGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGT	
M4 L nucl.	ACAACCTGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGT	
GenBank L nucl.	3361	3420
HR L nucl.	GCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCAT	
M2 L nucl.	GCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCAT	
M4 L nucl.	GCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCAT	
GenBank L nucl.	3421	3480
HR L nucl.	GACGTCTTTAGTTTCACGGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCT	
M2 L nucl.	GACGTCTTTAGTTTCACGGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCT	
M4 L nucl.	GACGTCTTTAGTTTCACGGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCT	
GenBank L nucl.	3481	3540
HR L nucl.	ACATCTATTTTGCAGCCTTGGGAAAGGGAAAGCAAAGTCCCACTGATTAAAAGAGCTACA	
M2 L nucl.	ACATCTATTTTGCAGCCTTGGGAAAGGGAAAGCAAAGTCCCACTGATTAAAAGAGCTACA	
M4 L nucl.	ACATCTATTTTGCAGCCTTGGGAAAGGGAAAGCAAAGTCCCACTGATTAAAAGAGCTACA	
GenBank L nucl.	3541	3600
HR L nucl.	CGTCTTAGAGATGCTATCTCTTGTTTGTGTAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA	
M2 L nucl.	CGTCTTAGAGATGCTATCTCTTGTTTGTGTAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA	
M4 L nucl.	CGTCTTAGAGATGCTATCTCTTGTTTGTGTAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA	
GenBank L nucl.	3601	3660
HR L nucl.	CTTTCTAACATCCACTCTTTAACAGGCGAAGAATGGACCAAAGGCAGCATGGGTTCAAA	
M2 L nucl.	CTTTCTAACATCCACTCTTTAACAGGCGAAGAATGGACCAAAGGCAGCATGGGTTCAAA	
M4 L nucl.	CTTTCTAACATCCACTCTTTAACAGGCGAAGAATGGACCAAAGGCAGCATGGGTTCAAA	

FIGURA 22-7

GenBank L nucl.	3661	3720
HR L nucl.	AGAACAGGGTCTGCCCTTCATAGGTTTTCGACATCTCGGATGAGCCATGGTGGGTTCCGA	
M2 L nucl.	AGAACAGGGTCTGCCCTTCATAGGTTTTCGACATCTCGGATGAGCCATGGTGGGTTCCGA	
M4 L nucl.	AGAACAGGGTCTGCCCTTCATAGGTTTTCGACATCTCGGATGAGCCATGGTGGGTTCCGA	
GenBank L nucl.	3721	3780
HR L nucl.	TCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTG	
M2 L nucl.	TCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTG	
M4 L nucl.	TCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTG	
GenBank L nucl.	3781	3840
HR L nucl.	GGAGATCAGAATTTTCGACTTTTATTCCAGCAACGTTGCTCTATGCTCAATTACCACC	
M2 L nucl.	GGAGATCAGAATTTTCGACTTTTATTCCAGCAACGTTGCTCTATGCTCAATTACCACC	
M4 L nucl.	GGAGATCAGAATTTTCGACTTTTATTCCAGCAACGTTGCTCTATGCTCAATTACCACC	
GenBank L nucl.	3841	3900
HR L nucl.	ACTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGTACAGATCATTATCATATTGCGCTGAAG	
M2 L nucl.	ACTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGTACAGATCATTATCATATTGCGCTGAAG	
M4 L nucl.	ACTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGTACAGATCATTATCATATTGCGCTGAAG	
GenBank L nucl.	3901	3960
HR L nucl.	TCTGTGTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCA	
M2 L nucl.	TCTGTGTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCA	
M4 L nucl.	TCTGTGTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCA	
GenBank L nucl.	3961	4020
HR L nucl.	GATGTATCCCATGTGCTGAAGACATGGAGGAATGGGGAAGGTTGTTGGGGACAAGAGATA	
M2 L nucl.	GATGTATCCCATGTGCTGAAGACATGGAGGAATGGGGAAGGTTGTTGGGGACAAGAGATA	
M4 L nucl.	GATGTATCCCATGTGCTGAAGACATGGAGGAATGGGGAAGGTTGTTGGGGACAAGAGATA	
GenBank L nucl.	4021	4080
HR L nucl.	AAACAGATCTATCCTTTAGAAGGGAATTGGAAGAATTTAGCACCTGCTGAGCAATCCTAT	
M2 L nucl.	AAACAGATCTATCCTTTAGAAGGGAATTGGAAGAATTTAGCACCTGCTGAGCAATCCTAT	
M4 L nucl.	AAACAGATCTATCCTTTAGAAGGGAATTGGAAGAATTTAGCACCTGCTGAGCAATCCTAT	
GenBank L nucl.	4081	4140
HR L nucl.	CAAGTCGGCAGATGTATAGGTTTCTATATGGAGACTTGGCGTATAGAAAATCTACTCAT	
M2 L nucl.	CAAGTCGGCAGATGTATAGGTTTCTATATGGAGACTTGGCGTATAGAAAATCTACTCAT	
M4 L nucl.	CAAGTCGGCAGATGTATAGGTTTCTATATGGAGACTTGGCGTATAGAAAATCTACTCAT	
GenBank L nucl.	4141	4200
HR L nucl.	GCCGAGGACAGTTCTCTATTTCCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC	
M2 L nucl.	GCCGAGGACAGTTCTCTATTTCCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC	
M4 L nucl.	GCCGAGGACAGTTCTCTATTTCCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC	

FIGURA 22-8

GenBank L nucl.	4201	4260
HR L nucl.	TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATACACCGGAGA	TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATACACCGGAGA
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATACACCGGAGA	.....
GenBank L nucl.	4261	4320
HR L nucl.	AGTCTGGCTCATTGGAAGAGGCCGGCCAAACGCAGTGTACGGAGGTTTGATTACTTGATT	AGTCTGGCTCATTGGAAGAGGCCGGCCAAACGCAGTGTACGGAGGTTTGATTACTTGATT
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	AGTCTGGCTCATTGGAAGAGGCCGGCCAAACGCAGTGTACGGAGGTTTGATTACTTGATT	.....
GenBank L nucl.	4321	4380
HR L nucl.	GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCCTTTCTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC	GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCCTTTCTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCCTTTCTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC	.....
GenBank L nucl.	4381	4440
HR L nucl.	GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCCCAACCTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG	GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCCCAACCTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCCCAACCTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG	.....
GenBank L nucl.	4441	4500
HR L nucl.	GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGGAAAATAC	GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGGAAAATAC
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGGAAAATAC	.....
GenBank L nucl.	4501	4560
HR L nucl.	AGATCACATTATTCACAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA	AGATCACATTATTCACAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	AGATCACATTATTCACAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA	.....
GenBank L nucl.	4561	4620
HR L nucl.	CCATTCTCTATTTCACCACCCTCTTGCAAATCCTATACAAGCCATTTTATCTGGGAAA	CCATTCTCTATTTCACCACCCTCTTGCAAATCCTATACAAGCCATTTTATCTGGGAAA
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	CCATTCTCTATTTCACCACCCTCTTGCAAATCCTATACAAGCCATTTTATCTGGGAAA	.....
GenBank L nucl.	4621	4680
HR L nucl.	GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG	GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG	.....
GenBank L nucl.	4681	4740
HR L nucl.	TGGGAAGACATACATGTGAAATCTTCACCAAGGACATATTATGTGTCCAGAGGAAATC	TGGGAAGACATACATGTGAAATCTTCACCAAGGACATATTATGTGTCCAGAGGAAATC
M2 L nucl.	.....	.....
M4 L nucl.	TGGGAAGACATACATGTGAAATCTTCACCAAGGACATATTATGTGTCCAGAGGAAATC	.....

FIGURA 22-9

GenBank L nucl.	4741	4800
HR L nucl.	AGACATGCTTGCAAGTTCGGGATTGCTAAGGATAATAATAAGACATGAGCTATCCCCCT	
M2 L nucl.	AGACATGCTTGCAAGTTCGGGATTGCTAAGGATAATAATAAGACATGAGCTATCCCCCT	
M4 L nucl.	AGACATGCTTGCAAGTTCGGGATTGCTAAGGATAATAATAAGACATGAGCTATCCCCCT	
GenBank L nucl.	4801	4860
HR L nucl.	TGGGGAAGGGAATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTTATTATACGACCACCCCT	
M2 L nucl.	TGGGGAAGGGAATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTTATTATACGACCACCCCT	
M4 L nucl.	TGGGGAAGGGAATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTTATTATACGACCACCCCT	
GenBank L nucl.	4861	4920
HR L nucl.	TACCCAAAGATGCTAGAGATGCCTCCAAGAATCCAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGG	
M2 L nucl.	TACCCAAAGATGCTAGAGATGCCTCCAAGAATCCAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGG	
M4 L nucl.	TACCCAAAGATGCTAGAGATGCCTCCAAGAATCCAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGG	
GenBank L nucl.	4921	4980
HR L nucl.	TTGGGCCAATTACCAACTGGCGCTCATTATAAAATTCGGAGTATATTACATGGAATGGGA	
M2 L nucl.	TTGGGCCAGTTACCAACTGGCGCTCATTATAAAATTCGGAGTATATTACATGGAATGGGA	
M4 L nucl.	TTGGGCCAGTTACCAACTGGCGCTCATTATAAAATTCGGAGTATATTACATGGAATGGGA	
GenBank L nucl.	4981	5040
HR L nucl.	ATCCATTACAGGGACTTCTTGAGTTGTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTA	
M2 L nucl.	ATCCATTACAGGGACTTCTTGAGTTGTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTA	
M4 L nucl.	ATCCATTACAGGGACTTCTTGAGTTGTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTA	
GenBank L nucl.	5041	5100
HR L nucl.	CTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATATTCAATAGTCTGTTAGAAATTATCAGGGTCA	
M2 L nucl.	CTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATATTCAATAGTCTGTTAGAAATTATCAGGGTCA	
M4 L nucl.	CTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATATTCAATAGTCTGTTAGAAATTATCAGGGTCA	
GenBank L nucl.	5101	5160
HR L nucl.	GTCATGCGAGGCGCCTCTCCTGAGCCCCCAGTGCCCTAGAACTTTAGGAGGAGATAAA	
M2 L nucl.	GTCATGCGAGGCGCCTCTCCTGAGCCCCCAGTGCCCTAGAACTTTAGGAGGAGATAAA	
M4 L nucl.	GTCATGCGAGGCGCCTCTCCTGAGCCCCCAGTGCCCTAGAACTTTAGGAGGAGATAAA	
GenBank L nucl.	5161	5220
HR L nucl.	TCGAGATGTGTAATGGTGAAACATGTTGGGAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGG	
M2 L nucl.	TCGAGATGTGTAATGGTGAAACATGTTGGGAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGG	
M4 L nucl.	TCGAGATGTGTAATGGTGAAACATGTTGGGAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGG	
GenBank L nucl.	5221	5280
HR L nucl.	ACTTGGGACTATTTCCTCCGACTCAAAGCAGGCTTGGGGCTTCAAATTGATTTAATTGTA	
M2 L nucl.	ACTTGGGACTATTTCCTCCGACTCAAAGCAGGCTTGGGGCTTCAAATTGATTTAATTGTA	
M4 L nucl.	ACTTGGGACTATTTCCTCCGACTCAAAGCAGGCTTGGGGCTTCAAATTGATTTAATTGTA	

FIGURA 22-10



GenBank L nucl.	5281	5340
HR L nucl.	ATGGATATGGAAGTTCGGGATTCTTCTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAAT	
M2 L nucl.	ATGGATATGGAAGTTCGGGATTCTTCTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAAT	
M4 L nucl.	ATGGATATGGAAGTTCGGGATTCTTCTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAAT	
GenBank L nucl.	5341	5400
HR L nucl.	TATGTGCACCGGATTTTGGATGAGCAAGGAGTTTAACTACAAGACTTATGGAACATAT	
M2 L nucl.	TATGTGCACCGGATTTTGGATGAGCAAGGAGTTTAACTACAAGACTTATGGAACATAT	
M4 L nucl.	TATGTGCACCGGATTTTGGATGAGCAAGGAGTTTAACTACAAGACTTATGGAACATAT	
GenBank L nucl.	5401	5460
HR L nucl.	ATTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGAC	
M2 L nucl.	ATTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGAC	
M4 L nucl.	ATTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGAC	
GenBank L nucl.	5461	5520
HR L nucl.	TTAGTTCAAACAGAAATTTAGTAGTTCTCAAACGCTGGAAGTATATATGGTATGTAAGGT	
M2 L nucl.	TTAGTTCAAACAGAAATTTAGTAGTTCTCAAACGCTGGAAGTATATATGGTATGTAAGGT	
M4 L nucl.	TTAGTTCAAACAGAAATTTAGTAGTTCTCAAACGCTGGAAGTATATATGGTATGTAAGGT	
GenBank L nucl.	5521	5580
HR L nucl.	TTGAAGAAATTAATCGATGAACCCAATCCCGATTGGTCTTCCATCAATGAATCCTGAAA	
M2 L nucl.	TTGAAGAAATTAATCGATGAACCCAATCCCGATTGGTCTTCCATCAATGAATCCTGAAA	
M4 L nucl.	TTGAAGAAATTAATCGATGAACCCAATCCCGATTGGTCTTCCATCAATGAATCCTGAAA	
GenBank L nucl.	5581	5640
HR L nucl.	AACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAGTACA	
M2 L nucl.	AACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAGTACA	
M4 L nucl.	AACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAGTACA	
GenBank L nucl.	5641	5700
HR L nucl.	TACTTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCCAATTCATTCCTGATCCTTTTGTGAACATTGAG	
M2 L nucl.	TACTTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCCAATTCATTCCTGATCCTTTTGTGAACATTGAG	
M4 L nucl.	TACTTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCCAATTCATTCCTGATCCTTTTGTGAACATTGAG	
GenBank L nucl.	5701	5760
HR L nucl.	ACTATGCTACAAATATTCCGAGTACCCACGGGTGTCTCATGCGGCTGCCTTAAATCA	
M2 L nucl.	ACTATGCTACAAATATTCCGAGTACCCACGGGTGTCTCATGCGGCTGCCTTAAATCA	
M4 L nucl.	ACTATGCTACAAATATTCCGAGTACCCACGGGTGTCTCATGCGGCTGCCTTAAATCA	
GenBank L nucl.	5761	5820
HR L nucl.	TCTGATAGACCTGCAGATTTATTGACCATTAGCCCTTTTTTATATGGCGATTATATCGTAT	
M2 L nucl.	TCTGATAGACCTGCAGATTTATTGACCATTAGCCCTTTTTTATATGGCGATTATATCGTAT	
M4 L nucl.	TCTGATAGACCTGCAGATTTATTGACCATTAGCCCTTTTTTATATGGCGATTATATCGTAT	

FIGURA 22-11

GenBank L nucl.	5821	5880
HR L nucl.	TATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGATACCTCCGAACCCCCATCAGATGGAATT	
M2 L nucl.	TATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGATACCTCCGAACCCCCATCAGATGGAATT	
M4 L nucl.	TATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGATACCTCCGAACCCCCATCAGATGGAATT	
GenBank L nucl.	5881	5940
HR L nucl.	GCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTTGCTGAGTTTGATGGAGAAA	
M2 L nucl.	GCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTTGCTGAGTTTGATGGAGAAA	
M4 L nucl.	GCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTTGCTGAGTTTGATGGAGAAA	
GenBank L nucl.	5941	6000
HR L nucl.	GACATTCCTACTATATCAACAGTGTATTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCTCGATTAGGTGG	
M2 L nucl.	GACATTCCTACTATATCAACAGTGTATTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCTCGATTAGGTGG	
M4 L nucl.	GACATTCCTACTATATCAACAGTGTATTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCTCGATTAGGTGG	
GenBank L nucl.	6001	6060
HR L nucl.	GAGGCTGTTTCAGTAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTC	
M2 L nucl.	GAGGCTGTTTCAGTAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTC	
M4 L nucl.	GAGGCTGTTTCAGTAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTC	
GenBank L nucl.	6061	6120
HR L nucl.	CCAAAAGATACCCGAAATTCAGACTCCTTGGCCCCAATCGGGAACCTGGATCAGATCTCTG	
M2 L nucl.	CCAAAAGATACCCGAAATTCAGACTCCTTGGCCCCAATCGGGAACCTGGATCAGATCTCTG	
M4 L nucl.	CCAAAAGATACCCGAAATTCAGACTCCTTGGCCCCAATCGGGAACCTGGATCAGATCTCTG	
GenBank L nucl.	6121	6180
HR L nucl.	GAATTGGTCCGAAACCAAGTTCGTCTAAATCCATTCAATGAGATCTTGTTCATCAGCTA	
M2 L nucl.	GAATTGGTCCGAAACCAAGTTCGTCTAAATCCATTCAATGAGATCTTGTTCATCAGCTA	
M4 L nucl.	GAATTGGTCCGAAACCAAGTTCGTCTAAATCCATTCAATGAGATCTTGTTCATCAGCTA	
GenBank L nucl.	6181	6240
HR L nucl.	TGTCGTACAGTGGATAATCATTGAAATGGTCAAATTTGCGAAATAACACAGGAATGATT	
M2 L nucl.	TGTCGTACAGTGGATAATCATTGAAATGGTCAAATTTGCGAAAAACACAGGAATGATT	
M4 L nucl.	TGTCGTACAGTGGATAATCATTGAAATGGTCAAATTTGCGAAAAACACAGGAATGATT	
GenBank L nucl.	6241	6300
HR L nucl.	GAATGGATCAATAGACGAATTTCAAAAGAAGACCGGTCTATCTGATGTTGAAGAGTGAC	
M2 L nucl.	GAATGGATCAATAGACGAATTTCAAAAGAAGACCGGTCTATCTGATGTTGAAGAGTGAC	
M4 L nucl.	GAATGGATCAATAGACGAATTTCAAAAGAAGACCGGTCTATCTGATGTTGAAGAGTGAC	

FIGURA 22-12

	6301	6360
GenBank L nucl.	CTACATGAGGAAAACTCTTGGAGAGATTAA.....	
HR L nucl.	CTACATGAGGAAAACTCTTGGAGAGATTAAAAATCATGAGGAGACTCCAACTTTAAGT	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	CTACATGAGGAAAACTCTTGGAGAGATTAA.....	
	6361	6395
GenBank L nucl.	.....	
HR L nucl.	ATGAAAAAACTTTGATCCTTAAGACCTCTTGTG	
M2 L nucl.	.....	
M4 L nucl.	.....	

FIGURA 22-13

GenBank L	a.a.	1	60
HR L a.a.		MEVHDFETDEFNDFNEDDYATREFLNPDERTYLNHADYNLNSPLISDDIDNLIKRFNSL	
M4 L a.a.		MEVHDFETDEFNDFNEDDYATREFLNPDERTYLNHADYNLNSPLISDDIDNLIKRFNSL	
GenBank L	a.a.	61	120
HR L a.a.		PIPSMWDSKNWDGVLEMLTSCQANPISTSQMHKWMGSWLMSDNHDASQGYSFLEHVDKEA	
M4 L a.a.		PIPSMWDSKNWDGVLEMLTSCQANPISTSQMHKWMGSWLMSDNHDASQGYSFLEHVDKEA	
GenBank L	a.a.	121	180
HR L a.a.		EITFDVVETVFIRGWGNKPIEYIKKERWTDSPKILAYLCQKFLDLHKLTLILNAVSEVELL	
M4 L a.a.		EITFDVVETVFIRGWGNKPIEYIKKERWTDSPKILAYLCQKFLDLHKLTLILNAVSEVELL	
GenBank L	a.a.	181	240
HR L a.a.		NLARTFKGKVRSSSHGTNICTRVRVPSLGPTFISEGWAYFKKLDIILMDRNFLMHVKDVIIG	
M4 L a.a.		NLARTFKGKVRSSSHGTNICTRVRVPSLGPTFISEGWAYFKKLDIILMDRNFLMHVKDVIIG	
GenBank L	a.a.	241	300
HR L a.a.		RMQTVLSNVCRIDNLFSEQDIFSLNITYRIGDKIVERQGNFSYDLIKMVEPICNLILMKL	
M4 L a.a.		RMQTVLSNVCRIDNLFSEQDIFSLNITYRIGDKIVERQGNFSYDLIKMVEPICNLILMKL	
GenBank L	a.a.	301	360
HR L a.a.		ARESRLVLPQFPMTENHIKTSVDEGAKIDEGIRFLHDQIMSVKTVDLTLVITYGSFRHWGH	
M4 L a.a.		ARESRLVLPQFPMTENHIKTSVDEGAKIDEGIRFLHDQIMSVKTVDLTLVITYGSFRHWGH	
GenBank L	a.a.	361	420
HR L a.a.		PFIDYYIGLEKLHSQVTMKKDIDVSYAKALASDLARIVLFQQFNDHKWFWNGDLLPHDH	
M4_L.pro		PFIDYYAGLEKLHSQVTMKKDIDVSYAKALASDLARIVLFQQFNDHKWFWNGDLLPHDH	
GenBank L	a.a.	421	480
HR L a.a.		PFKSHVKENTWPTAAQVQDFGDKWHELPLIKCFEIPDLLDPSIIYSKSHSMNRSEVLKH	
M4 L a.a.		PFKSHVKENTWPTAAQVQDFGDKWHELPLIKCFEIPDLLDPSIIYSKSHSMNRSEVLKH	
GenBank L	a.a.	481	540
HR L a.a.		VRMNPNTPIPSKKVLQTMIDTKATNWKEFLKEIDEKGLDDDDLIIGLKGKERELKLAGRF	
M4 L a.a.		VRMNPNTPIPSKKVLQTMIDTKATNWKEFLKEIDEKGLDDDDLIIGLKGKERELKLAGRF	
GenBank L	a.a.	541	600
HR L a.a.		FSLMSWKLREYFVITEYLIKTHFVPMFKGLTMADDLTAVIKKMLDSSSGQGLKSYEAICI	
M4 L a.a.		FSLMSWKLREYFVITEYLIKTHFVPMFKGLTMADDLTAVIKKMLDSSSGQGLKSYEAICI	

FIGURA 23-1

GenBank L	a.a.	601	660
HR L a.a.		ANHIDYEKWNHQRKLSNGPVFRVMGQFLGYPSLIERTHEFFEKSLIYNGRPDLMRVHN	
M4 L a.a.		ANHIDYEKWNHQRKLSNGPVFRVMGQFLGYPSLIERTHEFFEKSLIYNGRPDLMRVHN	
GenBank L	a.a.	661	720
HR L a.a.		NTLINSTQRVCWQGGEGGLEGLRQKGWILNLLVIQREAKIRNTAVKVLAAQGDNQVICT	
M4 L a.a.		NTLINSTQRVCWQGGEGGLEGLRQKGWILNLLVIQREAKIRNTAVKVLAAQGDNQVICT	
GenBank L	a.a.	721	780
HR L a.a.		QYKTKKSRNVVELQGALNQMVSNNEKIMTAIKIGTGKLGLLINDETMQSADYLNNGKIP	
M4 L a.a.		QYKTKKSRNVVELQGALNQMVSNNEKIMTAIKIGTGKLGLLINDETMQSADYLNNGKIP	
GenBank L	a.a.	781	840
HR L a.a.		IFRGVIRGLETKRWSRVTCVTNDQIPTCANIMSSVSTNALTVAHFAENPINANIQYNYFG	
M4 L a.a.		IFRGVIRGLETKRWSRVTCVTNDQIPTCANIMSSVSTNALTVAHFAENPINANIQYNYFG	
GenBank L	a.a.	841	900
HR L a.a.		TFARLLMMHDPALRQSLYEVDQKIPGLHSSTFKYAMLYLDPISIGGVSGMSLSRFLIRAF	
M4 L a.a.		TFARLLMMHDPALRQSLYEVDQKIPGLHSSTFKYAMLYLDPISIGGVSGMSLSRFLIRAF	
GenBank L	a.a.	901	960
HR L a.a.		PDPVTESLSFWRFIHVHARSEHLKEMSAVFGNPEIAKFRITHIDKLVEDPTSLNIAMGMS	
M4 L a.a.		PDPVTESLSFWRFIHVHARSEHLKEMSAVFGNPEIAKFRITHIDKLVEDPTSLNIAMGMS	
GenBank L	a.a.	961	1020
HR L a.a.		PANLLKTEVKKCLIESRQTIRNQVIKDATTIYLYHEEDRLRSFLWSINPLFPFLSEPKSG	
M4 L a.a.		PANLLKTEVKKCLIESRQTIRNQVIKDATTIYLYHEEDRLRSFLWSINPLFPFLSEPKSG	
GenBank L	a.a.	1021	1080
HR L a.a.		TFLGVADGLISLFQNSRTIRNSFKKKYHREDDLIVRSEVSSLTHLGLHLRSGCKMWT	
M4 L a.a.		TFLGVADGLISLFQNSRTIRNSFKKKYHREDDLIVRSEVSSLTHLGLHLRSGCKMWT	
GenBank L	a.a.	1081	1140
HR L a.a.		CSATHADTLRYKSWGRTVIGTTVPHPLEMLGPQHRKETPCAPCNTSGFNYSVHCFDGIN	
M4 L a.a.		CSATHADTLRYKSWGRTVIGTTVPHPLEMLGPQHRKETPCAPCNTSGFNYSVHCFDGIN	
GenBank L	a.a.	1141	1200
HR L a.a.		DVFSSRGPLPAYLGSKTSESTSILOPWERESKVPLIKRATRLRDAISWFVEPDSKLAMTI	
M4 L a.a.		DVFSSRGPLPAYLGSKTSESTSILOPWERESKVPLIKRATRLRDAISWFVEPDSKLAMTI	

FIGURA 23-2

GenBank L	a.a.	1201	1260
HR L a.a.		LSNIHSLTGEWTKRQHGFKRTGSALHRFSTSRMSHGGFASQSTAALTRLMATTDTMRDL	
M4 L a.a.		LSNIHSLTGEWTKRQHGFKRTGSALHRFSTSRMSHGGFASQSTAALTRLMATTDTMRDL	
GenBank L	a.a.	1261	1320
HR L a.a.		GDQNFDFLFQATLLYAQITTTVARDGWITSCTDHYHIACKSCLRPFIEEITLDSMDYTFP	
M4 L a.a.		GDQNFDFLFQATLLYAQITTTVARDGWITSCTDHYHIACKSCLRPFIEEITLDSMDYTFP	
GenBank L	a.a.	1321	1380
HR L a.a.		DVSHVLKTNWNGEGSWGQEIQIYPLEGNWQNLAPAEQSYQVGRGICIGFLYGDLAYRKSTH	
M4 L a.a.		DVSHVLKTNWNGEGSWGQEIQIYPLEGNWQNLAPAEQSYQVGRGICIGFLYGDLAYRKSTH	
GenBank L	a.a.	1381	1440
HR L a.a.		AEDSSLFPLSIQGRIRGRGFLKGLLDGLMRASCCQVIHRRSLAHLKR PANAVYGGLIYLI	
M4 L a.a.		AEDSSLFPLSIQGRIRGRGFLKGLLDGLMRASCCQVIHRRSLAHLKR PANAVYGGLIYLI	
GenBank L	a.a.	1441	1500
HR L a.a.		DKLSVSPFPLSLTRSGPIRDELETIPHKIPTSYPTSNRDMGVIVRNYPKYQCRLIEKGKY	
M4 L a.a.		DKLSVSPFPLSLTRSGPIRDELETIPHKIPTSYPTSNRDMGVIVRNYPKYQCRLIEKGKY	
GenBank L	a.a.	1501	1560
HR L a.a.		RSHYSQLWLFSDVLSIDFIGFFSISTTLLQILYKPFLSGDKNELRELANLSSLLRSGEQ	
M4 L a.a.		RSHYSQLWLFSDVLSIDFIGFFSISTTLLQILYKPFLSGDKNELRELANLSSLLRSGEQ	
GenBank L	a.a.	1561	1620
HR L a.a.		WEDIHVKFTTKDILLCPEEIRHACKFGIAKDNKDMSYPPWGRESRGITITTI PVYTTTP	
M4 L a.a.		WEDIHVKFTTKDILLCPEEIRHACKFGIAKDNKDMSYPPWGRESRGITITTI PVYTTTP	
GenBank L	a.a.	1621	1680
HR L a.a.		YPKNLEMPRIQNPLLSGIRLQQLPTGAHYKIRSILHGMGIHYRDFLSCGDGSGGMTAAL	
M4 L a.a.		YPKNLEMPRIQNPLLSGIRLQQLPTGAHYKIRSILHGMGIHYRDFLSCGDGSGGMTAAL	
GenBank L	a.a.	1681	1740
HR L a.a.		LRENVHSRGIFNSLLELGSVMRGASPEPPSALETLOGDKSRCVNGETCWEYPSDLCDPR	
M4 L a.a.		LRENVHSRGIFNSLLELGSVMRGASPEPPSALETLOGDKSRCVNGETCWEYPSDLCDPR	
GenBank L	a.a.	1741	1800
HR L a.a.		TWDYFLRLKAGLGLOIDLIVDMEVDRSSTSLKIETNVRNYVHRILDEQGVLIYKTYGTY	
M4 L a.a.		TWDYFLRLKAGLGLOIDLIVDMEVDRSSTSLKIETNVRNYVHRILDEQGVLIYKTYGTY	
GenBank L	a.a.	1801	1860
HR L a.a.		ICESEKNAVITILGPMFKTVOLVQTEFSSSQTSEVYMVCKGLKKLIDEPNPDWSSINESWK	
M4 L a.a.		ICESEKNAVITILGPMFKTVOLVQTEFSSSQTSEVYMVCKGLKKLIDEPNPDWSSINESWK	

FIGURA 23-3

GenBank L	a.a.	1861	1920
HR L a.a.		NLYAFQSSEQEFARAKKVSTYFTLTGIPSQFIPDPFVNIETMLQIFGVPTGVSHAAALKS	
M4 L a.a.		NLYAFQSSEQEFARAKKVSTYFTLTGIPSQFIPDPFVNIETMLQIFGVPTGVSHAAALKS	
GenBank L	a.a.	1921	1980
HR L a.a.		SDRPADLLTISLFYMAIISYYNINHIRVGPIPNPPSDGIAQNVGIAITGISFWLSLMEK	
M4 L a.a.		SDRPADLLTISLFYMAIISYYNINHIRVGPIPNPPSDGIAQNVGIAITGISFWLSLMEK	
GenBank L	a.a.	1981	2040
HR L a.a.		DIPLYQQCLAVIQQSFPPIRWEAVSVKGGYKQKWSTRGDGLPKDTRISDSLAPIGNWIRSL	
M4 L a.a.		DIPLYQQCLAVIQQSFPPIRWEAVSVKGGYKQKWSTRGDGLPKDTRISDSLAPIGNWIRSL	
GenBank L	a.a.	2041	2100
HR L a.a.		ELVRNQVRLNPFNEILFNQLCRTVDNHLKWSNLRKNTGMIWINRRISKEDRSILMLKSD	
M4 L a.a.		ELVRNQVRLNPFNEILFNQLCRTVDNHLKWSNLRKNTGMIWINRRISKEDRSILMLKSD	
GenBank L	a.a.	2101	2110
HR L a.a.		LHEENSWRD	
M4 L a.a.		LHEENSWRD	

FIGURA 23-4