



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 394**

51 Int. Cl.:

C12N 15/35 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99115161 .4**

96 Fecha de presentación : **13.08.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1077260**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2001**

54 Título: **Variantes de NS1 de parvovirus.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.07.2010

73 Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Nüesch, Jürg y
Rommelaere, Jean**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Variantes de NS1 de parvovirus.

La presente invención se refiere a la utilización de variantes de NS1 de parvovirus, según se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones. De esta manera, se refiere a la utilización de una variante de NS1 de parvovirus que presenta un equilibrio desplazado entre las actividades de replicación y transcripción del ADN (a) y la actividad de citotoxicidad (b), en la que uno o varios sitios de fosforilación se mutan mediante sustitución de aminoácidos, provocando el desplazamiento del equilibrio, y

(i) las actividades (a) se reducen o se eliminan, y la actividad (b) se mantiene o se incrementa, o

(ii) las actividades (a) se mantienen, y la actividad (b) se reduce o se elimina, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades tumorales.

El término “parvovirus” se refiere a un género de la familia de virus Parvoviridae. El género parvovirus comprende varios virus icosaédricos pequeños que pueden replicarse en ausencia de un virus ayudante. Los parvovirus contienen un ADN de una sola cadena que presenta una longitud de aproximadamente 5.000 pb. En cada uno de los extremos 3' y 5' del ADN existe una secuencia palindrómica. El ADN codifica dos proteínas de la cápside, VP1 y VP2, así como dos proteínas no estructurales reguladoras, NS-1 y NS-2. Estas últimas proteínas se encuentran fosforiladas y muestran una localización nuclear, o citoplasmática y nuclear, respectivamente. La proteína NS1 resulta necesaria para la replicación del ADN vírico y participa en la regulación de la expresión génica del virus. En particular, NS1 transactiva el promotor P38 y las actividades de unión a ADN, de helicasa y de formación de muescas en el ADN. Además, NS1 induce estrés citotóxico y/o citostático en células-huésped sensibles.

Los parvovirus habitualmente son bien tolerados por las poblaciones de su huésped natural, en el que persisten sin indicios patológicos evidentes. Esto se debe tanto a la protección de los fetos y neonatos gracias a la inmunidad materna, como a la inesperada restricción de la replicación de los parvovirus a un estrecho abanico de tejidos diana en proliferación en animales adultos. Esta tolerancia del huésped se refiere especialmente a parvovirus de roedor, por ejemplo el virus minúsculo del ratón (MVM) y el virus H-1 en sus huéspedes naturales respectivos, es decir en ratones y ratas. Además, el ser humano puede resultar infectado por estos últimos virus, sin ninguna evidencia de efectos perjudiciales asociados en los estudios epidemiológicos y ensayos clínicos existentes. Por otra parte, es conocido que determinados parvovirus, y especialmente parvovirus de roedor, son tanto oncotrópicos, es decir se acumulan preferentemente en tejidos neoplásicos y no normales, como oncosupresores, es decir presentan un efecto supresor tumoral de las células tumorales, en diversos modelos animales. Por lo menos parte del efecto oncosupresor se cree que se debe a una acción oncolítica directa mediada por NS1. Este efecto oncosupresor también ha sido demostrado contra células tumorales humanas trasplantadas en animales receptores.

Se ha considerado la utilización de parvovirus con fines terapéuticos. Por una parte aparentemente resulta de interés utilizar parvovirus como vectores para genes terapéuticos, es decir para introducir dichos genes en el genoma de las células. Por otra parte, se ha considerado la utilización de NS1 de parvovirus como toxina para el tratamiento de enfermedades tumorales. Sin embargo, los experimentos iniciales han proporcionado resultados insatisfactorios.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un producto con el que los parvovirus y la proteína NS1 de los mismos, respectivamente, puedan utilizarse para los fines anteriormente indicados.

Según la invención, lo anterior se consigue mediante la materia definida en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en los resultados del solicitante de que resulta posible interferir en las actividades de NS1 de parvovirus de manera que se desplace el equilibrio existente entre las actividades de replicación y de transcripción del ADN (a) y la actividad de citotoxicidad (b). En particular, las variantes de NS1 de parvovirus producidas, en las que las actividades de replicación del ADN y de transcripción (a) se reducen y se eliminan, respectivamente, mientras que la actividad de citotoxicidad (b) se mantiene o se incrementa. Además, las variantes de NS1 de parvovirus producidas, en las que la actividad de citotoxicidad (b) se reduce y se elimina, respectivamente, mientras que las actividades de replicación del ADN y de transcripción (a) se mantienen o se incrementan. Se indican ejemplos de dichas variantes de NS1 de parvovirus en la Tabla 1 y en la figura 1. Además, el solicitante reconoce que las variantes de NS1 de parvovirus anteriormente indicadas y los vectores de expresión que codifican las mismas, particularmente los parvovirus, respectivamente, resultan adecuados para fines terapéuticos.

Li *et al.*, Journal of Virology 64:4654-60, 1990, han estudiado el efecto de una mutación de la lisina 405 a serina en NS1 del parvovirus H-1 sobre la replicación del ADN, la transactivación del promotor tardío y la citotoxicidad. Nüesch *et al.*, Journal of Virology 72:8002-12, 1998, han estudiado la función de NS1 y afirman que se desconoce qué sitios de fosforilación en NS1 resultan relevantes para la activación de la función replicativa de NS1. Sin embargo, ninguno de los dos artículos informa de la utilización de variantes de NS1 de parvovirus que presenten mutaciones particulares en los sitios de fosforilación, destinadas al tratamiento de enfermedades tumorales.

Según la invención, los resultados del solicitante se utilizan para proporcionar un uso particular de una variante de NS1 de parvovirus según se define en las reivindicaciones.

La expresión “parvovirus” comprende cualquier parvovirus, particularmente un parvovirus de roedor, tal como el virus minúsculo del ratón (MVM) y el virus H-1.

La expresión “se encuentra desplazado el equilibrio entre las actividades de replicación y transcripción del ADN (a) y la actividad de citotoxicidad (b)” se refiere al hecho de que, en una variante de NS1 de parvovirus según la invención, dicho equilibrio se encuentra desplazado en comparación con la NS1 de parvovirus de tipo salvaje. En particular, el equilibrio puede encontrarse desplazado de manera que el efecto sea que las actividades de replicación y transcripción del ADN (a) se reduzcan y se eliminen, respectivamente, mientras que la actividad de citotoxicidad (b) se mantiene o se incrementa. La actividad de citotoxicidad (b) también puede reducirse y eliminarse, respectivamente, mientras que las actividades de replicación y transcripción del ADN (a) se mantienen o se incrementan. Este equilibrio puede determinarse mediante diversos métodos. Con respecto a la determinación de la actividad de replicación del ADN, se hace referencia a, por ejemplo, los métodos descritos en Legendre y Rommelaere, J. Virol. 66:5705, 1992; Cotmore *et al.*, Virology 190:365, 1992; Cotmore *et al.*, J. Virol. 67:1579, 1993; Cotmore y Tattersall, Embo. J. 13:4145, 1994. Respecto a la determinación de la actividad de transcripción, se hace referencia a los métodos descritos en, por ejemplo, Rhode y Richards, J. Virol. 61:2807, 1987. Con respecto a la determinación de la actividad de citotoxicidad se hace referencia a los ejemplos proporcionados posteriormente.

Según la invención, se utilizan variantes de NS1 de parvovirus en las que el desplazamiento del equilibrio se consigue mediante la mutación de uno o varios sitios de fosforilación. Resultan particularmente preferentes los variantes de NS1 de parvovirus que presentan una mutación en uno o varios de los sitios de fosforilación 283, 363, 394 y 463. Resultan todavía más preferentes las variantes de NS1 de parvovirus S283A, T363A, T394A y T463A, que se indican en la Tabla 1 y en la figura 1. En S283A, se intercambia una serina por una alanina en la posición 283, en T363A se intercambia una treonina por alanina en la posición 363, y en T394A se intercambia una treonina por alanina en la posición 283, en T363A se intercambia una treonina por alanina en la posición 363, en T394A se intercambia una treonina por alanina en la posición 394, y en T463A se intercambia una treonina por alanina en la posición 463.

El ADN de variantes de NS1 de parvovirus particulares se ha depositado en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) el 11 de agosto de 1999, es decir, la fig. 1.1 como *Escherichia coli* pRSV-NS:S283A bajo DSM 12994, la fig. 1.2 como *Escherichia coli* pRSV-NS:T363A bajo DSM 12995, la fig. 1.3 como *Escherichia coli* pRSV-NS:T394A bajo DSM 12996, y la fig. 1.4 como *Escherichia coli* pRSV-NS:T463A bajo DSM 12997.

Dicho ADN puede encontrarse presente en un vector y en un vector de expresión, respectivamente. Al experto en la materia le resultarán familiares los ejemplos del mismo. En el caso de un vector de expresión para *E. coli*, estos ejemplos son, por ejemplo, pGEMEX, derivados de pUC, pGEX-2T, pET3b, vectores de expresión basados en T7 y pQE-8. Para la expresión en levaduras, por ejemplo deben mencionarse pY100 e YcpadI, mientras que, por ejemplo, pKCR, pEFBOS, cDM8, pMSCND y pCEV4 deben mencionarse para la expresión en células animales. El vector baculovirus de expresión pAcSGHisNT-A resulta especialmente adecuado para la expresión en células de insecto.

El vector que contiene el ADN según la invención puede ser un virus, por ejemplo un adenovirus, virus Vaccinia, un virus AAV o un parvovirus, tal como MVM o H-1, resultando preferente un parvovirus. El vector también puede ser un retrovirus, tal como MoMULV, MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV o GaLV.

Para construir vectores de expresión que contengan el ADN, resulta posible utilizar métodos generalmente conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, por ejemplo, técnicas de recombinación *in vitro*, métodos sintéticos y métodos de recombinación *in vivo* tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, por ejemplo.

Además, la presente invención describe células huésped que contienen los vectores anteriormente indicados. Entre estas células huésped se incluyen células bacterianas, de levadura, de insecto y animales, preferentemente células de mamífero. Las cepas de *E. coli* HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21, XLIBLue y SG 13009, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las células animales L, A9, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa y las células de insecto sf9 resultan preferentes. Los métodos para transformar estas células huésped, de selección fenotípica de transformantes y de expresión del ADN según la invención mediante la utilización de los vectores anteriormente indicados son conocidos de la técnica.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de variantes de NS1 de parvovirus según la invención (figs. 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4) en comparación con un NS1 de tipo salvaje de parvovirus. En este contexto, se marca cada uno de los sitios mutados en las variantes de NS1 de parvovirus según la invención.

La presente invención se explica mediante los ejemplos.

ES 2 343 394 T3

Ejemplo 1

Preparación y purificación de variantes de NS1 según la invención

5 Se proporcionó el ADN de la variante S283A de NS1 según la invención en forma de fragmento EcoRV a BstEII obtenido mediante PCR quimérica utilizando dos cebadores mutagénicos. A continuación, este fragmento se insertó en el vector de expresión cortado correspondiente pTHisNS1 (Nusch *et al.*, Virology 209:122, 1995) para obtener pTHis NS1:S283A. Este vector codifica una proteína de fusión que comprende 6 residuos de histidina (pareja N-terminal) y S283A de la fig. 1 (pareja C-terminal). Para la expresión y purificación de S283A, se transfirió el gen
10 NS1 bajo el control del promotor del bacteriófago T7 al vector Vaccinia y se expresó en células eucarióticas mediante doble infección conjuntamente con vTF7-3 (un virus Vaccinia que expresa la ADN polimerasa del bacteriófago T7). Dieciocho horas después de la infección se recolectaron las células y se prepararon extractos nucleares. Seguidamente se purificó S283A etiquetado con histidinas, mediante cromatografía de afinidad en agarosa Ni-NTA y se analizó mediante SDS-PAGE al 10% (Nuesch *et al.*, *supra*).

15 Se demostró que una variante de NS1 de parvovirus según la invención podía prepararse en una forma de alta pureza.

20 También se produjeron y se purificaron de la misma manera las variantes T363A, T394A y T463A de NS1.

Ejemplo 2

Preparación y detección de un anticuerpo según la invención

25 Se recubrieron tubos con variantes de NS1 purificadas que se habían preparado tal como en el Ejemplo 1, y se aislaron anticuerpos monoclonales (por ejemplo scFv) que se unían específicamente a S283A a partir de la biblioteca fágica sintética humana de scFV VH+VL (Griffith *et al.*, EMBO J. 13:3245, 1994) según protocolos estándares de cribado tras >5 procedimientos de aislamiento y amplificación. Se secuenció la región variable del scFv aislado alojado
30 en el fagémido, para identificar las proteínas asociadas interactuantes con la variante de NS1 que alojaban dichos motivos de unión a partir de la comparación con genes conocidos en el banco de genes.

Lo anterior demostró que resultaba posible aislar los anticuerpos monoclonales según la invención.

35 Además, se utilizaron las variantes de NS1 para la inmunización de animales con el fin de obtener anticuerpos policlonales o monoclonales.

Ejemplo 3

Caracterización de las variantes S283A, T363A, T394A y T463A de NS1 de parvovirus según la invención

La caracterización de las variantes de NS1 de parvovirus comprendía la determinación de las actividades de replicación del ADN, transcripción, citotoxicidad, unión a ADN, formación de muescas y helicasa. Se utilizaron métodos
45 conocidos para este fin (ver la descripción, *supra*). Con respecto a la determinación de la actividad de helicasa se hace referencia a Stahl *et al.*, EMBO J. 5:1999, 1986. Respecto a la determinación de la actividad de formación de muescas, se hace referencia a Christensen *et al.*, J. Virol. 71:1405, 1997, y Nuesch *et al.*, *supra*, 1995. Con respecto a la determinación de la unión de ADN, se hace referencia a Cotmore *et al.*, J. Virol. 69:1652, 1995. Con respecto a la determinación de la actividad de citotoxicidad, se llevaron a cabo las etapas siguientes.

50 Se transfirieron variantes de NS1 a un vector de expresión que contenía el gen NS1 bajo el control del promotor MVMP4 de parvovirus (promotor genuino que controla los genes no estructurales del MVM) y la proteína fluorescente verde (EGFP) bajo el control de un promotor adicional. A continuación, se transfectaron estos constructos en células A9 utilizando lipofectamina (GibcoBRL) siguiendo las instrucciones del fabricante y se sometió a ensayo el impacto
55 de la variante NS1 sobre la viabilidad de las células en experimentos de curso temporal. Se identificaron las células transfectadas mediante fluorescencia de la EGFP. Se determinaron los efectos tóxicos en comparación con la NS1 de tipo salvaje o un vector que no contenía gen NS1 como función del tiempo, así como una medida de los cambios citopáticos de la morfología celular.

60

65

ES 2 343 394 T3

Se obtuvieron los datos indicados en la Tabla 1:

TABLA 1

	S283A	T363A	T394A	T463A	tipo salvaje
P38-TA	+	-	-	++++	++++
ACCA	+	++++	++	++	++
Nick-1	+	-	-	++	+++
Nick-2	+++	-	-	++++	++++
Nick-3	++	-	-		++++
Heli	++	-	(+)	++++	++++
Rep	+	-	-	+	++++
Cyto	++++++	++	+++	(+)	+++

Ejemplo 4

Expresión de variantes de NS1 tras la transducción utilizando vectores víricos recombinantes

Se transfirieron casetes de expresión de NS1 que contenían las variantes de NS1 según la invención bajo el control del promotor P4 parvovírico y una región 3' no traducida del parvovirus MVM para garantizar la estabilidad y la traducción del producto génico, a un fondo de genoma parvovírico tal como se ejemplifica en el Ejemplo 3, o un fondo de genoma vírico heterólogo, tal como virus Vaccinia (Ejemplo 1) o adenovirus. Se intercambiaron las regiones de promotor y de terminador según las necesidades. A continuación, se empaquetaron *in vivo* (tras la transfección transitoria en células eucarióticas) o *in vitro* los ácidos nucleicos que contenían las variantes de NS1, y se aislaron las partículas transductoras empaquetadas. Se utilizaron estas unidades transductoras que contenían las variantes de NS1 para estudios referentes a la regulación génica en cultivo de tejidos o en animales, aunque también como agentes terapéuticos solos o en combinación con otros agentes (tales como citoquinas) en enfoques terapéuticos génicos y del cáncer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una variante de NS1 de parvovirus que presenta un equilibrio desplazado entre las actividades de replicación del ADN y de transcripción (a) y la actividad de citotoxicidad (b), en la que uno o varios sitios de fosforilación se mutan por sustitución de aminoácidos, provocando el desplazamiento del equilibrio, y
- (i) las actividades (a) se reducen o se eliminan, y la actividad (b) se mantiene o se incrementa, o
- 10 (ii) las actividades (a) se mantienen y la actividad (b) se reduce o se elimina, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades tumorales.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la variante de NS1 de parvovirus se expresa mediante un vector de expresión que comprende un ADN codificante de la variante de NS1 de parvovirus.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 2, en la que el vector de expresión es H1 de parvovirus.
4. Utilización según la reivindicación 1, en la que las mutaciones se encuentran localizadas en los sitios 283, 363, 394 y/o 463.
- 20 5. Utilización según la reivindicación 4, es decir las variantes S283A, T363A, T394A y T463A de NS1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

NS1 de tipo salvaje

```

ATGGCTGGAAATGCTTACTCTGATGAAGTTTGGGAGCAACCAACTGGTTAAAGGAAAAA
261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 320
TACCGACCTTTACGAATGAGACTACTTCAAAACCCTCGTTGGTTGACCAATTCCTTTTTT

M A G N A Y S D E V L G A T N W L K E K -

AGTAACCAGGAAGTGTCTCATTGTGTTTTTAAAAATGAAAATGTTCAACTGAATGGAAAA
321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 380
TCATTGGTCCTTCACAAGAGTAAACAAAAATTTTACTTTTACAAGTTGACTTACCTTTT

S N Q E V F S F V F K N E N V Q L N G K -

GATATCGGATGGAATAGTTACAAAAAGAGCTGCAGGAGGACGAGCTGAAATCTTTACAA
381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 440
CTATAGCCTACCTTATCAATGTTTTTCTCGACGTCCTCCTGCTCGACTTTAGAAATGTT

D I G W N S Y K K E L Q E D E L K S L Q -

CGAGGAGCGGAAACTACTTGGGACCAAAGCGAGGACATGGAATGGGAAACCACAGTGGAT
441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 500
GCTCCTCGCCTTTGATGAACCTGGTTTCGCTCCTGTACCTTACCCTTTGGTGTACCTA

R G A E T T W D Q S E D M E W E T T V D -

GAAATGACCAAAAAGCAAGTATTCAATTTTGATTCTTTGGTTAAAAATGTTTATTTGAA
501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 560
CTTTACTGGTTTTTCGTTTATAAGTAAAACTAAGAAACCAATTTTTTACAAATAAACTT

E M T K K Q V F I F D S L V K K C L F E -

GTGCTTAACACAAAGAATATATTTCTCGGTGATGTTAATTGGTTTGTGCAACATGAATGG
561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 620
CACGAATTGTGTTTCTTATATAAAGGACCACTACAATTAACCAAACACGTTGTACTTACC

V L N T K N I F P G D V N W F V Q H E W -

GGAAAAGACCAAGGCTGGCACTGCCATGTAATAATTGGAGGAAAGGACTTTAGTCAAGCT
621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 680
CCTTTTCTGGTTCCGACCGTGACGGTACATGATTAACTCCTTTCTGAAATCAGTTCTGA

G K D Q G W H C H V L I G G K D F S Q A -

CAAGGGAAATGGTGGAGAAGGCAACTAAATGTTTACTGGAGCAGATGGTTGGTAACAGCC
681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 740
GTTCCCTTTTACCACCTCTTCGGTTGATTTACAAATGACCTCGTCTACCAACCATTGTCCGG

Q G K W W R R Q L N V Y W S R W L V T A -

TGTAATGTGCAACTAACACCAGCTGAAAGAATTAAACTAACAGAAATAGCAGAAGACAAT
741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 800

```

ES 2 343 394 T3

Fig. 1 (Continuación I)

```

ACATTACACGTTGATTGTGGTCGACTTTCTTAATTTGATTCTCTTTATCGTCTTCTGTGA
C N V Q L T P A E R I K L R E I A E D N, -
GAGTGGGTTACTCTACTTACTTATAAGCATAAGCAAACCAAAAAAGACTATACCAAGTGT
801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 860
CTCACCCAATGAGATGAATGAATATTCGTATTTCGTTTGGTTTCTGATATGGTTTACA
E W V T L L T Y K H K Q T K K D Y T K C. -
GTTCTTTTGGAAACATGATTGCTTACTATTTTTTAACTAAAAAGAAAATAAGCACTAGT
861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 920
CAAGAAAAACCTTTGTACTAACGAATGATAAAAAATTGATTTTCTTTTATTTCGTGATCA
V L F G N M I A Y Y F L T K K K I S T S -
CCACCAAGAGACGGAGGCTATTTTCTTAGCAGTGAAGTCTGGCTGAAAACTAAGTTTAA
921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 980
GGTGGTTCTCTGCCTCCGATAAAAGAATCGTCACTGAGACCGACCTTTTGATTGAAAAAT
P P R D G G Y F L S S D S G W K T N F L -
AAAGAAGGCGAGCGCCATCTAGTGAGCAAAGTATACACTGATGACATGCGGCCAGAAACG
981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1040
TTTCTTCCGCTCGCGGTAGATCACTCGTTTGATATGTGACTACTGTACGCCGGTCTTTGC
K E G E R H L V S K L Y T D D M R P E T -
GTTGAAACACAGTAACCACTGCGCAGGAACTAAGCGCGGCAGAAATCAAAGTAAAAAA
1041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1100
CAACTTTGGTGTGATTGGTGACGCGCTCTTTGATTGCGCGCGTCTTAAGTTTGATTTT
V E T T V T T A Q E T K R G R I Q T K K -
GAAGTTTCTATTAAAGTACACTTAAAGAGCTGGTGATAAAGAGTAACCTCACCAGAG
1101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1160
CTTCAAAGATAAATTTGATGTGAATTTCTCGACCACGTATTTTCTCATTGGAGTGGTCTC
E V S I K T T L K E L V H K R V T S P E -
GACTGGATGATGATGCAGCCAGACAGTTACATTGAAATGATGGCTCAACCAGGTGGAGAA
1161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1220
CTGACCTACTACTAGTCTGGTCTGTCAATGTAAGTTTACTACCGAGTTGGTCCACCTCTT
D W M M M Q P D S Y I E M M A Q P G G E -
AACCTGCTGAAAAATACGCTAGAGATTTGTACACTAACTCTAGCCAGAACCAAAACAGCA
1221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1280
TTGGACGACTTTTATGCGATCTCTAAACATGTGATTGAGATCGGTCTTGGTTTGTGCT
N L L K N T L E I C T L T L A R T K T A -
TTTGACTTAATTTTAGAAAAAGCTGAAACCAGCAAAGTAAACCACTTTTCACTGCCTGAC
1281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1340
AAACTGAATTAAATCTTTTTCGACTTTGGTCTTTGATTGGTTGAAAAGTGACGGACTG
F D L I L E K A E T S K L T N F S L P D -
ACAAGAACCTGCAGAAATTTTGCTTTTCATGGCTGGAAGTATGTTAAAGTTTGCCATGCT
1341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1400
TGTTCTTGGACGTCTTAAAAACGAAAAGTACCGACCTTGATACAATTTCAAACGGTACGA
T R T C R I F A F H G W N Y V K V C H A -

```


Fig. 1 (Continuación II)

```

ATTGCTGTGTTTTAAACAGACAAGGAGGCAAAAGAAATACTGTTTTATTTTCATGGACCA
1401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1460
TAAACGACACAAAATTTGTCTGTTCCCTCCGTTTTCTTTATGACAAAATAAAGTACCTGGT

I C C V L N R Q G G K R N T V L F H G P -

GCCAGCACAGGCAAATCTATTATTGCACAAGCCATAGCACAAGCAGTTGGCAATGTTGGT
1461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1520
CGGTGCTGTCCGTTTAGATAATAACGTGTTCCGGTATCGTGTTTCGTCAACCGTTACAACCA

A S T G K S I I A Q A I A Q A V G N V G -

TGCTATAATGCAGCCAATGTAAACTTTCCATTTAATGACTGTACCAACAAGAACTTGATT
1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1580
ACGATATTACGTCCGTTACATTTGAAAGGTAAATTACTGACATGGTTGTTCTTGAACATA

C Y N A A N V N F P F N D C T N K N L I -

TGGGTAGAAGAAGCTGGTAACTTTGGACAGCAAGTAAACCAGTTTAAAGCCATTTGCTCT
1581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1640
ACCCATCTTCTTCGACCATTGAAACCTGTCGTTTCATTTGGTCAAATTTTCGGTAAACGAGA

W V E E A G N F G Q Q V N Q F K A I C S -

GGTCAAACCTATTCGCATTGATCAAAAAGGAAAAGGCAGCAAACAGATTGAACCAACACCA
1641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1700
CCAGTTTGATAAGCGTAAGTAGTTTTTCCTTTTCCGTCGTTTGTCTAACTTGGTTGTGGT

G Q T I R I D Q K G K G S K Q I E P T P -

GTCATCATGACCACAAATGACAACATTACAGTGGTCAGAATAGGCTGCCAAGAAAGACCA
1701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1760
CAGTAGTACTGGTGTCTTACTCTTGTAATGTCACCAGTCTTATCCGACGCTTCTTTCTGGT

V I M T T N E N I T V V R I G C E E R P -

GAACACACTCAACCAATCAGAGACAGAATGCTTAACATTTCATCTAACACATACCTTGCCT
1761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1820
CTTGTGTGAGTTGGTTAGTCTCTGTCTTACGAATGTAAAGTAGATTGTGTATGGAACCGA

E H T Q P I R D R M L N I H L T H T L P -

GGTGACTTTGGTTTGGTTGACAAAATGAATGGCCCATGATTGTGCTTGGTTGGTAAAG
1821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1880
CCACTGAAACCAACCAACTGTTTTTACTTACCGGGTACTAAACACGAACCAACCATTC

G D F G L V D K N E W P M I C A W L V K -

AATGGTTACCAATCTACCATGGCAAGCTACTGTGCTAAATGGGCCAAAGTTCCTGATTGG
1881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1940
TTACCAATGGTTAGATGGTACCGTTTCGATGACACGATTTACCCCGTTTCAAGGACTAACC

N G Y Q S T M A S Y C A K W G K V P D W -

TCAGAAAAGTGGGCGGAGCCAAAGGTGCCAACTCCTATAAATTTACTAGGTTCCGGCACGC
1941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2000
AGTCTTTTGACCCGCTCGGTTTCCACGGTTGAGGATATTTAAATGATCCAGCCGTGCG

S E N W A E P K V P T P I N L L G S A R -

TCACCATTACGACACCGAAAAGTACGCCTCTCAGCCAGAAGTATGCACTAACTCCACTT
2001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2060
AGTGGAAGTGTGTGGCTTTTCATGCGGAGAGTCCGTCTTGATACGTGATTGAGGTGAA

```

ES 2 343 394 T3

Fig. 1 (Continuación III)

```

S P F T T P K S T P L S Q N Y A L T P L -
GCATCGGATCTCGAGGACCTGGCTTTAGAGCCTTGAGGCACACCAAATACTCCTGTTGCG
2061 -----+-----+-----+-----+-----+ 2120
CGTAGCCTAGAGCTCCTGGACCGAAATCTCGGAACCTCGTGTGGTTTATGAGGACAACGC

A S D L E D L A L E P W S T P N T P V A -
GGCACTGCAGAAACCCAGAACACTGGGGAAGCTGGTTCCAAAGCCTGCCAAGATGGTCAA
2121 -----+-----+-----+-----+-----+ 2180
CCGTGACGTCTTTGGGTCTTGTGACCCCTTCGACCAAGGTTTCGGACGGTTCTACCAGTT

G T A E T Q N T G E A G S K A C Q D G Q -
CTGAGCCCAACTTGGTTCAGAGATCGAGGAGGATTTGAGAGCGTGCTTCGGTGCGGAACCG
2181 -----+-----+-----+-----+-----+ 2240
GACTCGGGTTGAACCAGTCTCTAGCTCCTCCTAAACTCTCGCACGAAGCCACGCCTTGGC

L S P T W S E I E E D L R A C F G A E P -
TTGAAGAAAGACTTCAGCGAGCCGCTGAACTTGGACTAA
2241 -----+-----+-----+-----+-----+ 2279
AACTTCTTTCTGAAGTCGCTCGGCGACTTGAACCTGATT

L K K D F S E P L N L D * -

```

ES 2 343 394 T3

Fig. 1.1

1100 - 261 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

```

      →6
      |
1101 GAAGTTTCTATTAAACTACACTTAAAGAGCTGGTGCATAAAAGAGTAACCTCACCAGAG
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CTTCAAAAGATAATTTTGATGTGAATTTCTCGACCACGTATTTTCTCATTGGAGTGGTCTC
      |
      E V [S] I K T T L K E L V H K R V T S P E -
      →A S283A
  
```

1161 - 2279 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

Fig. 1.2

1340 - 261 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

```

      →6
      |
1341 ACAAGAACCTGCAGAAATTTTGCTTTTCATGGCTGGAAGTATGTTAAAGTTTGCCATGCT
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TGTTCTTGGACGTCTTAAAAACGAAAAGTACCGACCTTGATACAATTCAAACGGTACGA
      |
      T R [T] C R I F A F H G W N Y V K V C H A -
      →A T363A
  
```

1401 - 2279 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

Fig. 1.3

1400 - 261 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

1401 ATTTGCTGTGTTTAAACAGACAAGGAGGCAAAAGAAATACTGTTTATTTCATGGACCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1460
 TAAACGACACAAAATTGCTGTTCTCCTCCGTTTCTTTATGACAAAATAAAGTACCTGGT
 I C C V L N R Q G G K R N **T** V L F H G P -
 → A T 394 A

1461 - 2279 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

Fig. 1.4

1640 - 261 Secuencia de NS1 de tipo salvaje

1641 GGTCAATCTATTTCGCATTGATCAAAAAGGAAAAGGCAGCAACAGATTGAACCAACACCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1700
 CCAGTTTGATAAGCGTAACTAGTTTTTCCTTTCCGTCGTTTGTCTAACTGGTTGTGGT
 G Q **T** I R I D Q K G K G S K Q I E P T P -
 → A T 463 A

1701 - 2279 Secuencia de NS1 de tipo salvaje