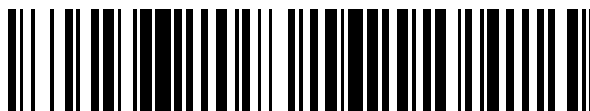


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 146**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13176757 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2826856**

54 Título: **Virus de ARN oncolítico genéticamente estable, método de fabricación y uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2016

73 Titular/es:

**SIA LATIMA (100.0%)
7-8 Kudras Street
2114 Olaine, LV**

72 Inventor/es:

**VENSKUS, DITE;
KALVINS, IVARS;
PJANOVA, DACE;
PETROVSKA, RAMONA y
AUZINS, JURGIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 566 146 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 de ARN oncolítico genéticamente estable, método de fabricación y uso del mismo

5 Campo técnico

La invención se refiere al desarrollo de una novedosa preparación contra el cáncer producida biotecnológicamente, concretamente, un virus de ARN oncolítico genéticamente estable, un método para la fabricación del virus oncolítico y el uso del mismo.

10 Antecedentes de la invención

15 La capacidad de los virus para destruir las células cancerosas se conoce desde hace más de un siglo [Kelly, E.; Russell, S.J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. Mol. Ther. 2007, 15, pp. 651-659] y ha habido numerosos éxitos prometedores en la terapia del cáncer experimental con diversos virus, sin embargo, su uso en la práctica clínica se ve obstaculizada por la dificultad de prever la interacción entre el tumor y su hospedador, así como entre el virus y la respuesta del sistema inmunitario humano a los anticuerpos virales.

20 Aunque las investigaciones clínicas sobre el uso de virus en la terapia del cáncer se iniciaron hace más de 50 años, en la actualidad sólo dos virus están aprobados para uso clínico en el tratamiento del cáncer. Son adenovirus con el gen E1 B 55K suprimido (Garber, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. J. Natl. Cancer Inst. 2006, 98, pp. 298-300) y enterovirus *Picornaviridae* pasivizados sin modificar del tipo Echo (patente eurasiática 007839; solicitud de patente europea 03733607), que actúan como inmunoestimulantes antitumorales.

25 El documento EP 1537872 divulga el uso de un virus ECHO-7 en la inmunoterapia activa de tumores. El virus se recuperó a partir del tracto intestinal y se aisló en un cultivo de células embrionarias primarias humanas. En la página 2, párrafo 18 se señala que se seleccionaron los serotipos no patogénicos del virus (en particular ECHO 7). El virus se cultivó en el tejido tumoral, a continuación en los fibroblastos embrionarios humanos y se repitió el proceso. Se demostró que el virus obtenido era capaz de mejorar la supervivencia en pacientes con melanomas de piel.

30 El desarrollo de virus oncolíticos novedosos eficaces sigue siendo actualmente un problema (Han Hsi Wong, Nicholas R. Lemoine, Yaohe Wang, Viruses 2010, 2, pp. 78-106).

35 Con el fin de aumentar el potencial del virus para infectar selectivamente las células cancerosas y aumentar la actividad oncolítica, se han divulgado una serie de virus modificados. Se caracterizan por la eliminación de genes específicos, evitando así su propagación en las células normales, o la integración de genes adicionales para mejorar las propiedades oncolíticas.

40 Sin embargo, el conocimiento limitado acerca de las modificaciones genéticas que proporcionan la selectividad y eficacia contra las células tumorales, da lugar a virus modificados con actividad citolítica inferior, en comparación con el original, o una mayor respuesta contra el virus del sistema inmunitario humano (S.Meerani, Yang Yao, Oncolytic viruses in cancer therapy. European Journal of Scientific Research, vol. 40 no.1 (2010), pp.156-171; Han Hsi Wong, Nicholas R. Lemoine, Yaohe Wang, Viruses 2010, 2, 78-106).

45 Aunque los virus son herramientas bien establecidas para el transporte de vectores en la célula, su uso está limitado por la alta inmunogenicidad de los virus (Peng, Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. Hum. Gene. Ther. 2005, 16, 1016-1027).

50 Una de las propiedades adversas más graves de los virus de tipo ECHO no modificados, incluyendo ECHO 7, es su capacidad de causar infecciones que pueden tener un resultado mortal (Wreghitt T.G., Gandy G.M., King A., Sutehall G., Fatal neonatal ECHO 7 virus infection, The Lancet, vol. 324, p.465, 1984). Estos virus son conocidos por ser responsables de la fiebre aftosa humana en Malasia (<http://www.vadscorner.com/echovirus7.html>), de la miocarditis en niños leucémicos (Midula M., Marzetti G., Borra G., Sabatino G., Myocarditis associated with ECHO 7 type infection in leukemic child, Acta Paediatrica Volume 65, Issue 4, pp. 649-651, July 1976), la meningitis aséptica, la enfermedad paralítica y fiebre (<http://virology-online.com/viruses/Enteroviruses6.htm>).

55 Por lo tanto la patogenicidad es una de las principales limitaciones que deben superarse en el uso de los virus de tipo ECHO 7 en el tratamiento de pacientes con cáncer.

60 Descripción de la invención

[PROBLEMA TÉCNICO]

65 Por lo tanto, el problema a resolver era el desarrollo de un virus oncolítico selectivo altamente eficiente sin patogenicidad en las células normales y de baja respuesta inmunitaria y que posea una alta estabilidad genética.

[SOLUCIÓN AL PROBLEMA]

Este problema se resuelve sorprendentemente mediante una modificación dirigida de un virus de ARN de cadena sencilla mediante el desarrollo de un método que utiliza el alto potencial de mutación del virus de ARN de cadena sencilla en combinación con una selección de mutantes dirigida específicamente, que permita la separación rápida del conjunto de especies mutantes con una actividad oncolítica alta y selectiva. Muchas células cancerosas son resistentes al virus (el virus no puede entrar en la célula y sobrevivir allí). Mediante la selección cuidadosa de líneas celulares en donde se modifica el virus y mediante el tratamiento previo adecuado de las células cancerosas es posible crear un virus genéticamente estable y no patógeno para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de la invención

Hemos desarrollado un método para modificar el virus ECHO 7 nativo, identificado por la secuencia del genoma SeqNo2, comprendiendo el método inicialmente realizar la adaptación del virus en las células cancerosas, atenuado por un agente antineoplásico, tal como dacarbazina, hacer pases del virus modificado a un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos, propagar en células de melanoma humano y hacer pases en un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos, opcionalmente tratado con ribavirina, aislar el virus y purificar el virus. El virus puede ser aislado y purificado por métodos conocidos.

Durante la realización de la adaptación del virus se pueden utilizar más de un tipo de líneas celulares.

La invención es como se expone en las reivindicaciones 1-12.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS APÉNDICES QUE CONTIENEN LAS SECUENCIAS (apéndices que forman parte de la descripción)

- Apéndice 1: Secuencia de nucleótidos del virus modificado (SEQ ID NO: 1)
- Apéndice 2: Secuencia de nucleótidos del virus no modificado (nativo) (SEQ ID NO: 2)
- Apéndice 3: Secuencia de nucleótidos del virus modificado después de la propagación durante 12 meses (SEQ ID NO: 3)
- Apéndice 4: Comparación de los genomas del virus modificado y el virus no modificado (nativo) (SEQ ID NO: 4)
- Apéndice 5: Comparación de las secuencias de aminoácidos del virus modificado y el virus no modificado (nativo) (SEQ ID NO: 5).

Descripción detallada de la invención

Hemos descubierto inesperadamente la idoneidad para este fin de un enterovirus *Picornaviridae* de tipo Echo 7 conocido, aislado a partir de intestino humano. Se determinó que la secuencia de nucleótidos original, determinada por un método estándar, era bastante similar a la del enterovirus *Picornaviridae* de tipo Wallace.

La comprobación de la actividad oncolítica de los enterovirus nativos aislados en el tejido de angiosarcoma demostró que ni los virus individuales ni sus combinaciones en una dosis de 3×10^5 TCID₅₀/0,03 ml poseían actividad oncolítica sustancial con excepción del tipo ECHO 7 que mostró la actividad más prometedora (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de los virus sobre el cultivo de tejido de angiosarcoma

Virus	Número de animales	Número de tumores en regresión el día 4 después de la infección	Aislado (virus supervivientes)	Título viral el día 4 TCD ₅₀ /0,1 ml
ECHO 4	6	0	ECHO 4	10^6 - 10^7
ECHO 7	6	0	ECHO 7	10^5 - 10^6
Coxsackie B-5	6	0	Coxsackie B-5	10^7 - 10^8
ECHO 4 + ECHO 7	6	2	ECHO 7	10^9
ECHO 4 + Coxsackie B-5	6	1	ECHO 4 + Coxsackie B-5	10^3 } 10^8
ECHO 7 + Coxsackie B-5	6	0	ECHO 7	10^4 }
Control	6	0		10^8

La inestabilidad del genoma de los virus de ARN de cadena sencilla es un hecho bien conocido; por lo tanto, dichos virus por lo general no son seleccionadas para la construcción de agentes virales oncolíticos.

La modificación del virus nativo aislado se realizó en varias etapas consecutivas.

ES 2 566 146 T3

La primera etapa aprovecha el alto potencial de mutación de los virus de ARN (en promedio una mutación en cada replicación) para desarrollar un mutante citopático mediante la replicación del virus en monocapa tripsinizada de cultivo de fibroblastos embrionarios humanos en presencia de suero bovino.

- 5 Las células se incubaron durante 10 días, llevando a cabo el pase cada vez que las células en cultivo habían degenerado un 50 %.

10 Al analizar el virus seleccionado en cultivo de células RD ya se observó un efecto citopático pronunciado 24 horas después de la infección. El título del virus desarrollado, determinado por el método de la última dilución fue $TCID_{50} = 1 \times 10^{-8}$.

Esta cepa se propagó, se aisló y se conservó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior en la producción de una cepa oncolítica selectiva y genéticamente estable.

- 15 El virus así obtenido fue modificado, utilizando el método desarrollado especialmente que comprende tres etapas.

1ª etapa de modificación en una primera línea de células tumoral

20 En la primera etapa de modificación, el virus se propagó en líneas de células tumorales atenuadas por el agente antineoplásico. En esta etapa se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

25 Una monocapa de estas células se trató con dacarbazina DTIC en dosis subtóxicas ($20\text{ }\mu\text{M}$). Después de tratar con dacarbazina, las células se transfirieron a medio de cultivo fresco y se pusieron en contacto con el virus y la propagación continuó sin añadir suero. Después de 24 horas de la puesta en contacto con el virus, se retiraron las células y el virus se aisló de los medios.

30 El virus se propagó de forma repetida (a través de pases) en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios humanos y de nuevo se utilizó para infectar la línea celular MCF-7. Este procedimiento se repitió 10 veces. Por lo tanto, esta etapa de modificación comprende alternativamente la propagación del virus en células de adenocarcinoma de mama humano y fibroblastos embrionarios humanos.

2ª etapa de modificación en una segunda línea de células tumorales

35 En la siguiente etapa de modificación, el virus como se describe anteriormente, se pone en contacto con el cultivo de células de adenocarcinoma gástrico. Una monocapa de estas células se trató con dacarbazina DTIC en dosis subtóxicas ($20\text{ }\mu\text{M}$).

40 La monocapa de estas células se infectó con el virus, el cual se aisló después de la modificación en la primera etapa y la propagación continuó en un medio de cultivo sin suero.

45 Después de 24 horas de la puesta en contacto con el virus, se retiraron las células y el virus se aisló de los medios. El virus se propagó de forma repetida (a través de pases) en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios humanos y de nuevo se utilizó para infectar la línea celular de adenocarcinoma gástrico. Este procedimiento se repitió 10 veces. Por lo tanto, esta segunda etapa de modificación comprende alternativamente la propagación del virus en células de adenocarcinoma gástrico y en fibroblastos embrionarios humanos.

En la primera etapa de modificación y en la segunda etapa de modificación, el procedimiento de propagación se terminó siempre mediante la propagación del último virus en el cultivo de fibroblastos embrionarios humanos.

- 50 3ª etapa de modificación en células de melanoma humano

El virus producido en la segunda etapa se utilizó para infectar tumores humanos obtenidos durante la cirugía.

55 Se obtuvieron tejidos cancerosos de melanoma de la cirugía de 23 pacientes tratados previamente con quimioterapia.

60 Los tejidos fueron infectados por el virus modificado y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ausencia de dióxido de carbono. Antes de ser utilizados para infectar nuevo material de tejido (tejido de melanoma fresco procedente de otro paciente), el virus modificado se propagó repetidamente en cultivos de fibroblastos embrionarios humanos hasta un título de $7\text{ lg } TCID_{50}/1\text{ ml}$.

El virus modificado se propagó en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios humanos que fueron tratados con ribavirina 5 mM 7 horas antes de la infección y cultivados durante 24 horas. El virus fue aislado a partir del cultivo y el procedimiento de propagación del virus en el cultivo de fibroblastos se repitió 10 veces.

65

Finalmente, se aisló el virus, se purificó y se propagó en cultivo de fibroblastos embrionarios humanos sin la adición de ribavirina.

5 El virus propagado se utilizó para la determinación de la secuencia. El genoma del virus modificado difiere del genoma del virus nativo no modificado congelado (cepa Echo 7 tipo Wallace de la base de datos NCBI) en aproximadamente un 10 %, la parte de la cubierta aproximadamente un 12 %.

10 Se observó que el virus modificado por el método descrito era sorprendentemente estable. Su genoma cambiaba solamente un 0,7 % después de pases continuos durante 12 meses (propagación durante 12 meses en el cultivo de pulmón embrionario humano MRC 5).

15 Es especialmente importante el hecho de que el virus modificado (en lo sucesivo VM) se caracteriza por un efecto citopático excepcionalmente alto sobre las células malignas y por una baja citotoxicidad en líneas de células normales, así como por la ausencia de toxicidad *in vivo* en ratones.

20 En experimentos con líneas celulares, se encontró que el VM era citotóxico para las líneas celulares de melanoma FM9, FM55, FM94 y SK-Mel26, células de carcinoma gástrico, células SCC25 de carcinoma de células escamosas oral humano, línea de células epiteliales humanas derivadas de un carcinoma de pulmón (A549), células de leucemia monocítica aguda THP-1, células RD de rhabdomyosarcoma, células HPAF-II de adenocarcinoma pancreático humano, células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), así como en cultivos celulares primarios de adenocarcinoma gástrico GC1 y la línea de cáncer de tiroides HA007.

25 En experimentos con animales, el VM provocó la regresión del sarcoma murino M-1, el fibrosarcoma MX-17 murino, así como de tumores trasplantables – sarcoma de Moloney (SM) y sarcoma KRS-321.

30 En un estudio clínico piloto, de un grupo de 46 pacientes con melanoma en estadio I, en 43 pacientes tratados con el VM no se observó progreso del melanoma durante 50 meses de observación. En el grupo control, el melanoma progresó en 10 de 31 pacientes sometidos a la terapia estándar.

35 En un estudio de 50 meses de 44 pacientes con melanoma en estadio II, el progreso del melanoma se detuvo en 38 pacientes, en comparación con el grupo control de 36 pacientes sometidos a la terapia estándar, donde el melanoma no progresó en 15 pacientes, pero sí en 21 pacientes. No se observaron efectos adversos graves en los pacientes tratados con el VM.

35 Aplicabilidad industrial

40 Hemos desarrollado una nueva cepa de virus (VM) con secuencia del genoma original, estable frente a la deriva genética, que posee actividad citopática contra varios tipos de tumores, caracterizada por una baja incidencia de efectos adversos y baja toxicidad que se puede utilizar con ventaja en la viroterapia del cáncer. Por lo tanto, hemos resuelto de forma inesperada el principal obstáculo en un uso más generalizado de virus de ARN en la medicina, hemos obtenido una cepa genéticamente estable que se puede utilizar en la fabricación continua estandarizada de una preparación viral oncolítica. La preparación viral se puede utilizar en la terapia contra el cáncer contra una variedad de células tumorales.

45 Ejemplos

La presente invención se describe con mayor detalle en los Ejemplos. Sin embargo, la invención no se interpreta como limitada a los ejemplos.

50 Virus

El virus modificado de acuerdo con la invención es el virus ECHO-7 (de la familia *Picornaviridae*, género Enterovirus, ECHO (entérico citopático humano huérfano) tipo 7, grupo IV, virus de ARN de cadena sencilla de sentido positivo).

55 Ejemplo 1. El aislamiento y la caracterización de la cepa de virus original

60 Se utilizó un método conocido de aislamiento (A.C. Rentz, J.E. Libbey, R.S. Fujinami, F.G. Whitby, and C.L. Byington. Investigation of Treatment Failure in Neonatal Echovirus 7 Infection. The Pediatric Infectious Disease Journal, Volume 25, Number 3, March 2006, 259) y de propagación en la línea celular BS-C-1 (CCL 26, ATCC) (Libbey JE, McCright IJ, Tsunoda I, et al. Peripheral nerve protein, P0, as a potential receptor for Theiler's murine encephalomyelitis virus. J Neurovirol. 2001;7:97-104. Pevear DC, Tull TM, Seipel ME, et al. Activity of pleconaril against enteroviruses. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2109-2115). La propagación del virus y la determinación del título se llevó a cabo en concordancia con el método publicado (Zurbriggen A, Fujinami RS. A neutralization-resistant Theiler's virus variant produces an altered disease pattern in the mouse central nervous system. J Virol. 1989;63:1505-1513).

65

Ejemplo 2. Modificación de virus

5 En la primera etapa de modificación, el virus se propagó en líneas de células tumorales atenuadas por un agente antineoplásico. Inicialmente, para la propagación se utilizó el cultivo de células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), cultivadas en medio DME (Sigma-Aldrich) con 10 % de suero (Gibco) y antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 100 UI/ml de estreptomycin) a 37 °C bajo una atmósfera que contiene CO₂ 5 % hasta el desarrollo de la monocapa.

10 La monocapa obtenida de estas células se trató con dacarbazina DTIC en dosis subtóxicas (20 µM). Después de tratar con dacarbazina, las células fueron transferidas a medio de cultivo fresco sin suero añadido, las células se pusieron en contacto con el virus y la propagación continuó.

15 Después de 24 horas de la puesta en contacto con el virus, las células se eliminaron y el virus se aisló de los medios. El virus se propagó repetidamente en cultivo celular de fibroblastos embrionarios humanos y se utilizó de nuevo para infectar la línea celular MCF-7. Este procedimiento se repitió 10 veces.

20 En la segunda etapa siguiente, el virus como se describe anteriormente, se puso en contacto con el cultivo de células de adenocarcinoma gástrico. El cultivo celular para la propagación se cultivó en medio DME (Sigma-Aldrich) con suero 10 % (Gibco) y antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 100 UI/ml de estreptomycin) a 37 °C en atmósfera que contenía CO₂ 5 % hasta el desarrollo de la monocapa.

25 La monocapa obtenida de estas células se trató con dacarbazina DTIC en dosis subtóxica (20 µM). Después de tratar con dacarbazina, las células fueron transferidas a medio de cultivo fresco sin suero añadido, las células se pusieron en contacto con el virus y la propagación continuó.

Después de 24 horas de la puesta en contacto con el virus, las células se eliminaron y los virus se aislaron de los medios. El virus se propagó repetidamente en cultivo celular de fibroblastos embrionarios humanos y se utilizó de nuevo para infectar la línea celular de adenocarcinoma gástrico. Este procedimiento se repitió 10 veces.

30 En la tercera etapa, el virus producido en la segunda etapa se utilizó para infectar los tumores humanos, obtenidos en la cirugía. Los tejidos cancerosos de melanoma se obtuvieron de la cirugía de 23 pacientes tratados previamente con quimioterapia.

35 Las células tumorales fueron separadas de las células de grasa, del tejido necrótico y de la sangre, se mantuvieron a 0 °C durante 24 horas, se fragmentaron y en forma de trozos de tejido de un tamaño de aproximadamente 0,1 cm³ se sumergieron en medio de Eagle (4 ml de medio por 10 mg de tejido), se infectaron con el virus preparado y se incubaron en ausencia de dióxido de carbono a 37 °C.

40 El medio fue reemplazado por una porción fresca cada día hasta la destrucción del tumor, determinado morfológicamente y visualmente por el nivel de oxidación del medio.

45 El título del virus se determinó todos los días en la muestra de medio sin tejido tumoral. La tasa de reproducción del virus se determinó a partir del título del virus a la conclusión de un experimento en comparación con el día 0. Tal modificación del virus se realizó en tejidos obtenidos de 23 pacientes.

Antes de ser utilizado para infectar un material de tejido nuevo, el virus modificado se propagó cada vez repetidamente en cultivo de fibroblastos embrionarios humanos hasta un título de 7 lg TCID₅₀/1 ml.

50 El virus modificado se propagó en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios humanos que fueron tratados con ribavirina 5 mM 7 horas antes de la infección y se cultivó durante 24 horas. El virus se aisló a partir del medio de cultivo y el procedimiento se repitió 10 veces.

55 Finalmente, se aisló el virus, se purificó y se propagó en cultivo de fibroblastos embrionarios humanos sin la adición de ribavirina.

La muestra de virus propagado se utilizó para la determinación de la secuencia del genoma, la actividad antineoplásica y la estabilidad replicativa mediante pases del mismo durante 12 meses en cultivo de fibroblastos embrionarios humanos con determinación repetida de la secuencia del genoma (Apéndice 1).

60 Ejemplo 3. Determinación de la secuencia del genoma del virus

65 El aislamiento, la amplificación y secuenciación del genoma del virus aislado, modificado y cultivado se realizó de acuerdo con el método conocido [Chua BH, McMinn PC, Lam SK, Chua KB. Comparison of the complete nucleotide sequences of echovirus 7 strains UMMC and the prototype (Wallace) strain demonstrates significant genetic drift over time. J Gen Virol. 2001 Nov; 82(Pt 11): 2629-39].

Para este propósito, se seleccionaron 96 enterovirus con secuencia completa del genoma del NCBI Gene bank. Se descargaron las secuencias completas del genoma de estos virus y se compararon mediante el programa Vector NTI.

- 5 Basándose en los resultados de la comparación, se determinaron las regiones más conservadoras de los genomas de los virus y 13 pares de oligonucleótidos degenerados seleccionados en estas regiones, que abarcan la longitud del potencial genoma de los enterovirus. Después de la síntesis de los primeros 13 fragmentos, se produjeron otros 13 pares de nucleótidos. Estos pares de oligonucleótidos eran específicos del virus y estaban diseñados para producir fragmentos solapantes. Después de la construcción de la secuencia del genoma completo, el genoma del virus se secuenció repetidamente con los cebadores específicos del virus.

Ejemplo 3.1. La secuencia del genoma del virus no modificado (nativo)

- 15 La secuencia del virus nativo se produjo a partir de 26 fragmentos de PCR solapantes separados, sintetizados a partir de los cebadores enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores usados para secuenciar el genoma completo del virus

Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Posición	Región diana
Eo7-1F	TTAAAACAGCCTGTGGGTTG	20	1-20	5'UTR
Eo7-1R	GAAACACGGACACCCAAAGTAG	22	545-566	5'UTR
Eo7-2F	CCATGGGACGCTTCAATACT	20	391-410	5'UTR
Eo7-2R	GCACCAGTCTTTTGTGTCTGA	20	758-777	VP4
Eo7-3F	CGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	25	542-566	5'UTR
Eo7-3R	TCDGGRAAYTTCCACCACCACCC	23	1178-1200	VP2
Eo7-4F	CGACAGGGTGAGATCCCTAA	20	979-998	VP2
Eo7-4R	TTTCACCCTTCGTGAGGTTC	20	1381-1400	VP2
Eo7-5F	GCATCYAARTTYCAYCARGG	20	1289-1308	VP2
Eo7-5R	CACATKGGKGAATSGTGAC	20	1676-1695	VP2
Eo7-6F	GTGGATCAACTTGCGCACTA	20	1513-1532	VP2
Eo7-6R	AAATTGTGGCATAGCCGAAG	20	1797-1816	VP3
Eo7-7F	GTCACSATTGCMCCMATGTG	20	1676-1695	VP2
Eo7-7R	CTTNATRCTYCCTGACCAGTGTG	23	2055-2077	VP3
Eo7-8F	AAGCATGGACGCATATCACA	20	1921-1940	VP3
Eo7-8R	GATATGGGTTCCACATTGC	20	2174-2194	VP3
Eo7-9F	CACACTGGTCAGGRAGYATNAAG	23	2055-2077	VP3
Eo7-10F	CAAGTGTGTGCTCCTGTGCT	20	2350-2369	VP3
Eo7-9R	CCTATTGGCGCTGTCTTGAT	20	2694-2713	VP1
Eo7-11F	ACCAAAGATCAAGACAGCGC	20	2687-2706	VP1
Eo7-11R	TTGGCACCCACACTCTGATA	20	3178-3197	VP1
Eo7-12F	ACCAGTCCGGTGCTGTTTAC	20	3336-3355	VP1-2A
Eo7-12R	TCCAYACACARTTYTGCCAGTC	23	3401-3423	2A
Eo7-13F	CARAAYTGTGTGTGGGAAGACTA	23	3407-3429	2A
Eo7-13R	CCCTGYTCCATKGCTTCATCYTCYARC	27	3748-3774	2A-2B
Eo7-14F	TTACCCAGTCACCTTCGAGG	20	3535-3554	2A
Eo7-14R	TGTTTTTCTTCACTTCCGG	20	4181-4200	2C
Eo7-15F	GTTRGARGATGATGCNATGGARCARGG	27	3748-3774	2A-2B
Eo7-15R	TCAATACGGYRTTGSWCTTGAA	23	4409-4431	2C
Eo7-16F	CCTYTRTAYGCVGCGYARGC	20	4343-4362	2C
Eo7-17F	TTCAAGWSCAAAYRCCGTATTGA	23	4409-4431	2C
Eo7-16R	AAATGAATGGCCTTHCCACACAC	23	4922-4944	2C
Eo7-18F	CTDGTGTGTGGRAAGGCIATNCA	23	4919-4941	2C
Eo7-18R	TATGCTCCYTGRAARCCTGCAAA	23	5309-5330	3A-3B
Eo7-19F	CAAGCCCTAACCACGTTTGT	20	5252-5271	3A

Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Posición	Región diana
Eo7-19R	ACCCGTAGTCAGTCACCTGG	20	5740-5759	3C
Eo7-20F	TTTGCAGGTTYCARGGWGCATA	23	5309-5330	3A-3B
Eo7-20R	GCYCTWGTGGGRAAGTTRTACAT	23	5723-5745	3C
Eo7-21F	GTGTTGGATGCCAAGGAACT	20	5555-5574	3C
Eo7-21R	ATGGGCTCCGATCTGATGTC	20	6203-6222	3D
Eo7-22F	TTCCCACWAGRGCAGGCCARTGYGG	26	5907-5832	3C
Eo7-22R	CTCCAAAABASRTCYGGGTCTCA	23	6572-6594	3D
Eo7-23F	TGAAGGAATGCATGGACAAA	20	6360-6379	3D
Eo7-23R	ATGGGTATTGCTCATCTGCC	20	7078-7097	3D
Eo7-24F	TGYGACCCRGAYSTVTTTTGGAG	23	6572-6594	3D
Eo7-24R	TCRTGDATDTCYTTCATGGGCA	22	7116-7137	3D
Eo7-25F	CCTGGACGAATGTGACCTTT	20	7041-7060	3D
Eo7-25R	CCCTACCGCACTTTTATCCA	20	7384-7403	3'UTR
Eo7-26F	ATCCAYGARTCHATYAGRTGGAC	23	7130-7152	3D
Eo7-26R	CCGCACCGAATGCGGAGAATTTAC	24	7404-7427	3'UTR
UTR - región sin traducir.				

Se obtuvieron secuencias del extremo 5' terminal y del extremo 3' terminal, usando métodos de 5'-RACE y 3'-RACE, correspondientemente.

- 5 Como resultado, se encontró que la secuencia del genoma completo del virus no modificado consistía en 7434 nucleótidos, excluyendo la secuencia poli A (Apéndice 2, SEQ ID NO: 2).

10 El extremo 5' terminal (5'NTR) no traducible contiene 742 nucleótidos, seguido de la parte codificante que se inicia a partir del codón de iniciación (AUG) en la posición 743, contiene codones para los 2196 aminoácidos y termina con el codón de parada (UAA) en la posición 7331 (Apéndice 2). El extremo 3'-terminal (3'NTR) no traducible de esta cepa contiene 100 nucleótidos, seguido de la secuencia de poli A.

Ejemplo 3.2. La secuencia del virus modificado (VM)

- 15 La secuencia del virus de partida se produjo a partir de 26 fragmentos de PCR solapantes separados, sintetizados usando los cebadores enumerados en la Tabla 2.

Se obtuvieron las secuencias del extremo 5' terminal y del extremo 3' terminal, usando métodos de 5'-RACE y 3'-RACE, correspondientemente.

20 Como resultado, se encontró que la secuencia del genoma completo del virus modificado consistía en 7427 nucleótidos, excluyendo la secuencia poli A (Apéndice 1; SEQ ID NO1).

25 El extremo 5' terminal (5'NTR) no traducible de esta cepa contiene 742 nucleótidos, seguido de la secuencia de codificación. La parte codificante que contiene información acerca de la poliproteína del virus, se inicia con el codón de iniciación (AUG) en la posición 743, contiene codones para los 2914 aminoácidos y termina con el codón de parada (UAA) en la posición 7325 (Apéndice 1). El extremo 3' terminal (3'NTR) de esta cepa contiene 100 nucleótidos, seguido de la secuencia de poli A.

30 Ejemplo 3.3. La secuencia del genoma del virus modificado después de la propagación durante 12 meses

La secuencia del virus modificado se produjo a partir de 26 fragmentos de PCR solapantes separados, sintetizados usando los cebadores enumerados en la Tabla 2.

- 35 Las secuencias del extremo 5' terminal y el extremo 3' terminal de esta cepa se obtuvieron utilizando métodos de 5'-RACE y 3'-RACE, correspondientemente.

40 Como resultado, se encontró que la secuencia del genoma completo del virus modificado consistía en 7427 nucleótidos, excluyendo la secuencia poli A (Apéndice 3). El extremo 5' terminal (5'NTR) no traducible contiene 742 nucleótidos, seguido de la parte codificante, que se inicia con el codón de iniciación (AUG) en la posición 743, contiene codones para los 2194 aminoácidos y termina con el codón de parada (UAA) en la posición 7325 (Apéndice 3). El extremo 3' terminal (3'NTR) no traducible de esta cepa contiene 100 nucleótidos, seguido de la secuencia poli A.

Ejemplo 3.4. Comparación de los genomas del virus modificado (VM) y de la cepa nativa

La comparación de los genomas del virus modificado (VM) y de la cepa de partida se proporciona en el Apéndice 4.

- 5 La diferencia en la secuencia de nucleótidos, calculada por el programa Vector NTI es sustancial, 10 % para el genoma completo y 12 % para la parte codificante de las proteínas de la cubierta del virus. Las secuencias de aminoácidos de las cepas modificadas y de partida se enumeran en el Apéndice 5.

Ejemplo 3.5. La secuencia del genoma del virus modificado después de la propagación durante 12 meses

- 10 Los cambios en la secuencia del genoma del virus modificado (VM) después de pases continuos durante 12 meses no excedieron el 0,7 % de la secuencia inicial.

- 15 Se encontró que todos los cambios eran sustituciones de un nucleótido, parcialmente mutaciones silenciosas (sin cambio de aminoácido). Si el aminoácido cambiaba, su posición era en la parte polimórfica del genoma, evidentemente, sin influencia destacable en la actividad del virus.

Ejemplo 4. Pases de virus

- 20 El VM se pasó por métodos conocidos y se propagó durante 12 meses en el cultivo de células de pulmón embrionario humano MRC 5 (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell Emilia, Brescia - Laboratorio Centro Substrati Cellulari, N° de catálogo BS CL 68 (origen: American Type Culture Centre Collection, Rockville, Md, EE.UU.), libre de bacterias, virus, hongos o micoplasmas y posteriormente se conservó congelado a -70 °C.

- 25 Ejemplo 5. Determinación de la actividad antineoplásica del virus modificado (VM)

- 30 En experimentos con líneas celulares, se encontró que el VM era citotóxico para las líneas celulares de melanoma FM9, FM55, FM94 y SK-Mel26, células de carcinoma gástrico, células SCC25 de carcinoma de células escamosas oral humano, línea de células epiteliales humanas derivadas de un carcinoma de pulmón (A549), células de leucemia monocítica aguda THP-1, células RD de rhabdomyosarcoma, células HPAF-II de adenocarcinoma pancreático humano, células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), así como en cultivos celulares primarios de adenocarcinoma gástrico GC1 y la línea de cáncer de tiroides HA007.

- 35 Así, por ejemplo, las inyecciones de VM durante 3 días causó la reducción de la masa de sarcoma M-1 en un 55 % (en 11 de 22) de los animales, en comparación con el 6 % (en 1 de 18) de regresión espontánea en el grupo de control.

- 40 Tras el trasplante del sarcoma KRS-321 en el día 5 después de la inyección del VM en una dosis de 15×10^6 TCID₅₀ en ratas Wistar, en el 44 % de los animales (11/25) se observó la regresión del tumor, mientras que en el grupo control no hubo casos de regresión.

- 45 Tras el ensayo de la actividad antineoplásica de la muestra de virus después de 12 meses de pases en las mismas líneas celulares de cáncer y en los tumores trasplantados no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa respecto al VM original.

Ni el VM ni el virus pasado durante 12 meses causó ninguna reacción tóxica en ratones intactos.

Ejemplo 6. Actividad antineoplásica del virus modificado en el tratamiento de pacientes

- 50 El tratamiento de pacientes con melanoma con el virus modificado (VM) se realizó de acuerdo con el siguiente esquema: la terapia se inició 2-3 semanas después de la extirpación del tumor mediante la administración intramuscular de 2 ml de solución con título de 2×10^6 TCID₅₀/ml – 2×10^8 TCID₅₀/ml durante 3 días consecutivos con inyecciones de apoyo a intervalos mensuales de acuerdo con el mismo esquema de 3 días. Después del cuarto mes, la preparación de virus se administró una vez al mes durante los siguientes 8 meses. En los 2 años siguientes la terapia de apoyo se continuó con la misma dosis, aumentando gradualmente el intervalo entre las administraciones a 6, 8 y 12 semanas.

- 60 En un estudio clínico piloto, de un grupo de 46 pacientes con melanoma en estadio I, en 43 pacientes tratados con el VM no se observó progreso del melanoma durante 50 meses de observación. En el grupo control, el melanoma progresó en 10 de 31 pacientes sometidos a la terapia estándar.

- 65 En un estudio de 50 meses de 44 pacientes con melanoma en estadio II, el progreso del melanoma se detuvo en 38 pacientes, en comparación con el grupo control de 36 pacientes sometidos a la terapia estándar, donde el melanoma no progresó en 15 pacientes, pero sí en 21 pacientes.

La eficacia del tratamiento se caracteriza por los siguientes ejemplos:

- 5 Caso 1. Mujer, edad 76, *Melanoma cutis dorsi*
Op. 11.09.2009. *Excisio tu cutis dorsi*
pT4b N0 M0
No se realizó biopsia del NC
Ex consilio: seguimiento
Op. 07.04.2010. *LAE axillaris sin.*
10 *Mts l/n axillaris sin*
Ex consilio: Roferon
Roferon 6 ml 3x a la semana desde 24.06.2010 hasta 30.08.2010.
El tratamiento se suspendió debido a los efectos secundarios.
En Octubre de 2010 comenzó la terapia con la preparación del virus en dosis de 2 ml con título 2×10^6 TCID₅₀/ml
– 2×10^8 TCID₅₀/ml. El tratamiento fue bien tolerado y no se documentó progresión de la enfermedad hasta
15 01.02.2012.
- Caso 2. Mujer, 42 años, *Melanoma cutis dorsi*
Op. 25.05.2008. *Excisio tu cutis dorsi*
20 pT4a N0 M0, *Clark V*, *Breslow* 9 mm
No se realizó biopsia del NC
La preparación del virus (2 ml con título 2×10^6 TCID₅₀/ml – 2×10^8 TCID₅₀/ml se administró desde 27.06.2008
hasta 27.06.2011.
21.01.2011. Ecografía: recurrencia en la cicatriz
Op. 02.02.2011. *Excisio*. Examen histológico: granuloma.
25 La administración de la preparación del virus (2 ml con título 2×10^6 TCID₅₀/ml – 2×10^8 TCID₅₀/ml prosiguió hasta
27.06.2011.
Durante el período de observación (hasta diciembre de 2011) no se documentó observación de progresión de la
enfermedad.
- 30 Caso 3. Mujer, 57 años, *Melanoma cutis dorsi*
Op.19.08.2007. *Excisio tu cutis dorsi*
P T3b N0 M0
No se realizó biopsia del NC
Recomendaciones: seguimiento
35 Op. 10.12.2009. *LAE colli dx*. Examen histológico: *mts l/n colli dx* Progresión de la enfermedad – Ecografía el
22.02.2010: *mts l/n colli* 22.02.2010. *Ex consilio*: no se recomendó cirugía debido al volumen tumoral. La
preparación del virus (2 ml con título 2×10^6 TCID₅₀/ml – 2×10^8 TCID₅₀/ml se administró desde el 22.02.2010 y en
la actualidad sigue en progreso.
40 Última visita en el centro el 22.11.2011 – la enfermedad se ha estabilizado.
- Caso 4. Mujer, 58 años, *Melanoma cutis dorsi*
Op. Abril 2004. *Excisio tu cutis dorsi*, *LAE axillaris sin.*
45 pT4b, N2c, M0 (*Breslow* 15 mm)
Reexcisio Enero 2006, Septiembre 2006 (recurrencia local)
Terapia con IFN desde Octubre de 2006 hasta Mayo de 2007.
Reexcisio cum dermoplasticum Febrero de 2007, Mayo de 2007, Septiembre de 2007. La preparación del virus (2
ml con título 2×10^6 TCID₅₀/ml – 2×10^8 TCID₅₀/ml desde Febrero de 2008 hasta Abril de 2011.
Metástasis viscerales Febrero de 2011.
50 *Exitus letalis* Octubre de 2011.

Posología

55 La preparación viral para el tratamiento terapéutico puede ser en forma de solución acuosa inyectable que contiene
el virus modificado que tiene la secuencia del genoma estable como se explicó anteriormente, por ejemplo, en el
título de 2×10^6 TCID₅₀/ml – 2×10^8 TCID₅₀/ml. La solución que lleva el virus puede ser cualquier solución estéril
fisiológicamente aceptable, especialmente una solución de cloruro de sodio. La preparación se almacena y se
transporta en estado congelado y se descongela a temperatura ambiente antes del uso. La preparación puede ser
60 en viales u en otras unidades de envase en los volúmenes que se corresponden una sola dosis inyectada de una
vez al paciente.

La preparación se puede administrar mediante la inyección por vía intramuscular (i.m.) al paciente después de la
extirpación del tumor en cuestión, cuando la herida haya cicatrizado. La dosis puede ser de 2 ml de la solución antes
mencionada de una vez. La administración intramuscular por inyección se repite de acuerdo con el esquema
65 terapéutico planificado.

ES 2 566 146 T3

Apéndice 1: SEQ ID NO: 1
Secuencia del virus modificado

```

0   UUAAAACAGC CUGUGGGUUG UUCCCACCCA CAGGGCCAC  UGGGCGCUAG
50  CACACUGGUA UCACGGUACC CUUGUGCGCC UGUUUUAUCU UCCCCUCCCC
100 ACUGUAACUU AGAAGAAUGA CAUAAACGGU CAACAGAUAG CUCAGUACAC
150 CAACUGAGCC CCGACCAAGC ACUUCUGUUA CCCC GGACCG AGUAACAAUA
200 GGCUGCUCGC GCGGCUGAAG GUGAAAACGU UCGUUACCCG GCCAAUUACU
250 UCGAGAAACC UAGUACCACC AUGAAGGUUG CGCAGCGUUU CGCUCCGCAC
300 AACCCAGUG  UAGAUCCAGU CGAUGAGUCA CCGCACUCCC CACGGGCGAC
350 CGUGGCGGUG GCUGCGCUGG CGGCCUGCCU AUGGGGCAAC CCAUGGGACG
400 CUUCAAUACU GACAUGGUGC GAAGAGUCUA UUGAGCUAAU UGGUAGUCCU
450 CCGGCCCCUG AAUGCGGCUA AUCCUAACUG CGGGGCAAGU GCCCACAAAC
500 CAGUGGGUGG CUUGUCGUAA CGGGUAACCC UGCAGCGGAA CCGACUACUU
550 UGGGUGUCCG UGUUUCCUUU UAUUUUUUU  CUGGCUCUU  AUGGUGACAA
600 UUGAGAGAUU GUURCCAUAU AGCUAUUGGA UUGGCCRUU  GGUAGUAAC
650 AGAGCAAUCA UAUCCUCUU  UGUUGGAUUU AUACCACUUG AUUCCACUAG
700 UUACAACACU CUGCUACAUA UUAUUUGCUU AAUACAAGA  AGAUGGGAGC
750 ACAAGUAUCG ACACAAAAGA CUGGUGCACA CGAGACSSGU  UUGAGCGCUA
800 ACGGACACUC UAUCAUUCAC UAUACCAACA UCAACUACUA  CAAAGAUGCA
850 GCAUCCAACU CAGCCAACAG GCAGGAUUUC ACCCAGGAUC  CAGGUAAGUU
900 CACUGAACCG GUCAAGGAUA UCAUGAUCAA AUCGAUGCCC  GCCCUAAACU
950 CACCGUCCGC GGAGGAGUGC GGGUACAGCG ACAGGGUGAG  AUCCCUAACG
1000 CUCGGCAACU CAACCAUUAC CACUCAAGAA AGUGCAAACG  UAGUUGUUGG
1050 CUAUGGCAGG UGGCCAGAGU ACUUGAAAGA UGAAGAAGCU  ACUGCGGAAG
1100 AUCAGCCAAC ACAACCCGAU GUAGCCACRU GCAGGUUCUA  CACGUUGGAA
1150 UCCGUCCAGU GGGAGAAAAA UAGCGCUGGA UGGUGGUGGA  AGUUCCCCGA
1200 AGCACUUAAG GACAUGGGCC UCUUUGGUCA GAACAUGCUU  UACCACUAUC
1250 UCGGUAGAGC AGGCUACACU AUACAUGUGC AGUGCAACGC  AUCCAAUUU
1300 CAUCAGGGCU GUCUACUUGU UGUCUGUGUA CCUGAAGCUG  AGAUGGGGUG
1350 UUCCAGACG  GACAAAGAGG UUGCUGCGAU GAACCUCACG  AAGGGUGAAA
1400 CGGCGCACAA GUUUGAACCA ACCAAAACCA CAGGCGGCCA  CACAGUGCAA
1450 UCCAUAGUGU GCAACGCGGG UAUGGGCAUC GGCGUGGGGA  ACCUCACCAU
1500 CUACCCUCAC CAGUGGAUCA ACUUGCGCAC UAAUAACUGC  GCUACA AUUG
1550 UGAUGCCGUA UAUAUUUCA  GUACCCAUGG AUAACAUGUU  UAGGCACUAC
1600 AAUUUCACGC UAAUGGUGAU CCAAUUUGCA CCCCUGGAUU  ACAAUGCCCA
1650 AGCAUCUGAG UACGUACCUG UAACUGUCAC AAUAGCCCCA  AUGUGUGCAG
1700 AAUACAAUGG UUUAAAGGUG GCUUACCAGC AAGGGCUGCC  AGUGC UAAAU
1750 ACACCGGAA  GCAAUCAGUU UAUGACAUCG GAUGAUUUUC  AAUCCCCUUC
1800 GGCUAUGCCA CAAUUUGAUG UGACUCCGCA CAUGGACAUC  CCAGGUGAAG
1850 UGCACAACCU CAUGGAGAUU GCAGAAGUUG AUUCGGUGGU  ACCUGUUAAC
1900 AACACUGCGG CCAAUCUGCA AAGCAUGGAC GCAUAUCACA  UAGAGGUGAA
1950 CRCAGGAAAU CACCAAGGUG AAAAGAUUU  CGCUUCCAG  AUACAACCCG
2000 GGCUGGAUUC AGUGUUUAAG AGAACACUGC UAGGUGAAGU  GCUCAAUUUA
2050 UACGCGCACU GGUCAGGGAG CAUUAAGCUA ACAUUCACAU  UUUGUGGUUC
2100 AGCAAUGGCC ACGGGCAAGC UACUUUAGC AUACUCCCA  CCUGGCGCCG
2150 AUGUACCGGC UAGCAGAAAG CAGGCAAUGA UGGAACCCA  UAUAUCUGG
2200 GACUUAGGGC UGCAAUCCAG UUGCGUUCUA UGUUUUCCAU  GGAUCUGUCA
2250 GACACAUUUA CGCCUAGUGC AACAGGAUGA GUACACCAGC  GCCGGCAAUG
2300 UCAACUGCUG GUAUCAGACA GGUUAGUGG  UCCACCCGG  CACACCCAAC
2350 AAGUGUGUCG UCCUGUGCUU UGUGUCAGCG UGUAAUGACU  UCUCGUGCGG
2400 CAUGCUGCGU GACACACCAU UCAUCGGCCA AACACACUG  CUACAAGGUG

```

ES 2 566 146 T3

2450 AUACGGACGU GGCCGUCAAC AAUGCAGUAG CCAGGGUAGC UGAUACAAUU
 2500 GCCAGUGGGC CCAGCAACUC CACUAGCAUU CCUGCACUAA CCGCAGUUGA
 2550 GACUGGGCAC ACAUCACAGG UAGAGCCUAG UGAUACAAUG CAAACACGGC
 2600 AUGUAAAGAA CUACCAUUCG CGAUCUGAAU CAACAAUAGA GAACUJCCUU
 2650 AGCCGGUCGG CCUGUGUUAU UAUUGAAGAG UACUUUACCA AAGAUCAAGA
 2700 CAGCGCCAAU AGGUACAUGU CAUGGACUUA AAAUGCUAGA AGGAUGGUGC
 2750 AAUUGAGGCG AAAGUUUGAA CUGUUCACAU ACAUGC GGU UGUAUUGGAG
 2800 AUCACAUUUG UUAUCACUAG UAGACAACUG CCUGGGACUA GCAUCGCGCA
 2850 AGACAUGCCG CCACUGACAC ACCAAAUCAU GUAUAUACCC CCUGGUGGUC
 2900 CAGUACCAAA CAGUGUGACC GAUUUUGCAU GGCAAACUUC GACUAAUCCA
 2950 AGUAUCUUUU GGACUGAGGG CAUGCCCCC CCGCGUAUGU CCAUACCAUU
 3000 JAUAAAGCAUA GGGAAUGCAU ACAGCAACUU UUAUGACGGR UGGUCGCACU
 3050 UCUCACAAAA UGGGGUUAUAC GGCUACAAUG CAUUAAAACA CAUGGGCAAA
 3100 UUAUACGCAC GCCAUGUGAA CAAAGACACA CCGUACCAGA UGUCCAGUAC
 3150 GAUUCGUGUG UACUUUAAAC CCAAACAUU CAGAGUGUGG GUGCCAAGAC
 3200 CACCACGUUU GUGCCCCUUA AUAAAUCUA GUAACGUUAA CUUUGACCCA
 3250 ACCAACCUAA CUGAUUCAAG AUCAAGUAUA ACAUAUGUGC CAGACACUUA
 3300 CCGUCGGAA GUCCGUACAG CUGGAAAUU CCGCCACCAG UCCGCGCUG
 3350 UUUACGUGGG UAAUUACAGA AUAGUGAACA GGCAACCUCG CACGCACAAC
 3400 GACUGGCAAA ACUGUGUGUG GGAAGACUAC AACAGAGACC UCCUUGUGAG
 3450 CACCACUACA GCCCAUGGGU GUGACACUUA AGCCAGAUGU CAGUGCACAG
 3500 CAGGCGUAUA UUUUUGUGCC UCAAGGAACA AACAUUACCC AGUCACCUUC
 3550 GAGGGGCCAG GCUUGGUGGA AGUUCAGGAG AGCGAGUACU ACCCAAAAAG
 3600 AYAUACAGUC CACGUGCUUC UAGCUGCAGG AUUUUCUGAA CCGGGCGAUU
 3650 GUGGCGGAAU CCUCAGAUGU CAACACGGCG UGAUCGGUUA CGUCACCAUG
 3700 GGUGGAGAGG GGGUCGUUGG GUUUGCCGAC GUCAGAGACC UACUGGGUU
 3750 AGAGGAUGAU GCCAUGGAAC AGGGCGUAAG AGACUAUGUU GAACAUCGUA
 3800 GAAAUUCUUU CGGCUCAGGU UUCACCAAUC AAAUUUGUGA ACAGGUCAAC
 3850 CUCCUCAAAAG AGUCAUUGGU UGGACAGGAU UCUAUUCUGG AAAAAUCCCU
 3900 UAAGGCUCUA GUUAAGAUUA UCUCAGCACU GGUCRUUGUA GUGAGAAAUC
 3950 ACGAUGAUCU CAUAACGGUU ACCGCCACUC UAGCUUUAAU UGGUUGCACC
 4000 UCUUCUCCGU GCGGUGGGU CAAGCAGAAG GUGUCACAAU AUUAUGGAAU
 4050 ACCCAGGGCC GAGCGACAAA ACAAUAGCUG GCUCAAGAAG UUUACUGAGA
 4100 UGACCAACGC CUGCAAGGGC AUGGAGUGGA UAGCCAUAAA AAUUCAAAAG
 4150 UUUAUUGAGU GGCUUAAAGU CAAGAUUCUG CCGGAAGUGA AGGAAAAACA
 4200 CGAGUUCUCC AACAGGCUAA AGCAAUACC ACUCCUAGAG AGCCAGAUG
 4250 CAACCAUAGA GCAGAGUGCA CCAUCGCAGA GUGAUCAAGA GCAACUCUUC
 4300 UCCAACGUCC AGUACUUCGC CCAUUUUGC AGAAAUGAUG CGCCAUUGUA
 4350 CGCUGCCGAA GCGAAGAGAG UGUUCUCACU UGAGAAGAAA AUGAGCAACU
 4400 ACAUACAGUU CAAGUCCAAA UGCGUAUUG AGCCUGUAUG CUUACUCCUA
 4450 CAUGGCAGCC CAGGGGCCGG AAAGUCCGUG GCCACCAACU UGAUUGGCAG
 4500 AUCCCUCGCA GAAAAACUJA ACAGCUCUGU RUACUCCCUA CCACCAGACC
 4550 CCGACCACUU UGACGGCUAC AAGCAGCAAG CGGUCGUGAU CAUGGAUGAC
 4600 UUAUGCCAAA AUCCUGAUGG AAAAGAUGUC UCACUAUUUU GUCAGAUGGU
 4650 UUCUAGCGUG GACUUUGUAC CACCGAUGGC UGCGCUAGAG GAAAAAGGAA
 4700 UCCUAUUUAC CUCCCCGUUC GUGUUGGCAU CAACCAACGC UGGGUCCAUC
 4750 AAUGCACCCA CUGUGUCUGA CAGCAGAGCG CUCGCUAGGA GAUUCACUU
 4800 UGACAUGAAC AUUGAAGUCA UUUCUAUGUA CAGUCAAAAAC GGCAAGAUCA
 4850 ACAUGCCCAU GUCAGUAAA ACAUGUGAUG AAGAGUGUUG UCCAGUUAAC
 4900 UUCAAAAGGU GCUGCCCGUU GGUGUGUGGA AAGGCYAUGC AAUUCAUUGA
 4950 UAGGAGAACU CAAGUUAGAU AUUCGCUGGA CAUGCUAGUU ACUGAAAUGU
 5000 UUAGGGAGUA UAACCAUAGA CACAGUGUGG GAGCCACUCU UGAAGCUCUG
 5050 UUCAAGGGC CACCAGUCUA CAGAGAGAUC AAAAUCAGCG UCGCCCCAGA

ES 2 566 146 T3

5100 GACACCCCCA CCACCAGCUA UUGCUGAUUU ACUGAAAUCA GUGGACAGUG
 5150 AAGCUGUGAG GGAUACUGC AAGGAGAGAG GGUGGCUUGU GCCAGAGAUC
 5200 AAUUCUACCC UACAAAUAGA GAAGCAUGUG AGUAGAGCAU UCAUAUGUUU
 5250 ACAAGCCCUA ACCACGUUUG UUCAGUUGC UGGUAUAAUA UACAUUAUUU
 5300 ACAAUUUAUU UGCAGGUUUC CAAGGCGCCU ACACAGGGAU GCCCAACCAG
 5350 AAACCUAAGG UGCCCACCCU GAGACAGGCC AAAGUACAGG GCCCAGCGUU
 5400 UGAGUUCGCU GUGGCGAUGA UGAAAAGGAA CGCCAGUACA GUAAAAACCG
 5450 AGUACGGUGA AUUCACCAUG CUUGGCAUUU ACGACAAGUG GGCGGUGUUA
 5500 CCGCGCCACG CCAAGCCUGG CCCACCAUC UUGAUGAAUG AUCAGGAAGU
 5550 CGGCGUGUUG GAUGCCAAGG AACUAGUUGA UAAAGAUGGG ACAAUUCUAG
 5600 AAUUGACUCU CCUGAAGCUC AACCGUAACG AAAAGUUCAG AGAUUUUAGG
 5650 GGGUUUCUAG CAAGAGAAGA GGUUGAAGUG AAUGAAGCUG UCCUAGCAAU
 5700 AAAUACAAGC AAAUUCUUUA ACAUGUACAU ACCAGUGGGC CAGGUGACUG
 5750 ACUACGGGUU UCUGAACCCUG GGAGGGACUC CCACGAAGAG AAUGCUC AUG
 5800 UAUAACUUC CAACUAGAGC AGGUCAGUGU GGAGGUGUCC UCAUGUCAAC
 5850 AGGGAAAGUC CUGGGAAUAC AUGUAGGAGG GAAUGGACAU CAAGGGUUCU
 5900 CAGCGGCACU CCUCAGGCAC UACUUAACG AGGAGCAGGG UGAAAUAGAA
 5950 UUCAUUGAGA GCUCAAAAGGA CGCGGGAUUC CCUGUGAUCA ACACUCCCAG
 6000 UAAGACAAAA UUGGAACCAA GUGUGUUUCA CCAGGUGUUC GAGGGCAACA
 6050 AGGAACCAGC GGUCCUUAGA AAUGGGGACC CACGACUCAA AGCCAACUUC
 6100 GAGGAAGCAA UCUUCUCCAA GUACAUUGGC AAUGUCAACA CGCAUGUAGA
 6150 UGAGUACAUG UUGGAGGCUG UGGACAUUA UGCAGGACAA CUAGCUACUC
 6200 UGGACAUCAG UACGGAGCCC AUGAAGCUAG AGGACGCCGU GUAUGGUACA
 6250 GAGGGGCUUG AAGCACUAGA CCUAACCACC AGUGCAGGCU ACCCUUACGU
 6300 GGCCCUUGGC AUCAAGAAAA GAGAUUUUCU AUCUAAGAAG ACUAAAGACC
 6350 UCACUAAGUU GAAGGAAUGC AUGGACAAAU AUGGCCUAAA UUUGCCAAUG
 6400 GUAACCUACG UCAAAGAUGA GUUGAGAUCU GCUGAGAAGG UGGCCAAGGG
 6450 AAAAUCCAGG CUUAUUGAGG CUUCUAGUCU CAAUGACUCA GUAGCAAUGA
 6500 GGCAAAACAU UGGAAAUUUA UAUAAGACCU UUCACCUCAA CCCGGGCAUC
 6550 GUUACGGGCA GUGCUGUUGG GUGUGAUCCA GAUGUGUUUU GGAGCAAGAU
 6600 CCCUGUUAUG CUUGAUGGAC AUCUCAUAGC UUUUGACUUA UCAGGCUAUG
 6650 ACGCUAGCCU CAGCCCAGUG UGGUUUGCAU GUUUGAAACU UCUCCUAGAG
 6700 AAACUAGGGU AUACAAACAA GGAAACAAAC UACAUAGAUU ACCUCUGUAA
 6750 UUCCCAUCAC CUGUAUAGAG ACAAGCACUA CUUUGUAAGA GGCGGUAUGC
 6800 CAUCAGGGUG UUCAGGCACC AGCAUAUUUA AUUCCAUGAU UAACAACAUC
 6850 AUAAUCAGGA CUCUCAUGCU GAAGGUUUUA AAAGGCAUUG AUUUGGACCA
 6900 AUUCAGAAUG AUUGCCUAG GGAUGAUGU GAUUGCUCUCC UAUCCGUGGC
 6950 CUAUCGAUGC UUCGCUGUUA GCUGAAGCAG GAAAAGAUUA UGGUUUAAUC
 7000 AUGACCCAG CAGACAAAGG CGAGUGCUUC AACGAGGUAA CCUGGACGAA
 7050 UGUGACCUUU CUGAAAAGGU ACUUUAGGGC AGAUGAGCAA UACCCAUUUC
 7100 UGGUCCAUC UGUUAUGCCA AUGAAGGACA UCCAUGAGUC UAUUAGGUGG
 7150 ACCAAAGAUC CCAAGAACAC ACAGGAUCAU GUGCGCUCGC UGUGCCUAUU
 7200 GGCUUGGCAC AACGGGGAGC AAGAAUAUGA GGAGUUUAUU GC CAAGAUA
 7250 GAAGCGUGCC CGUUGGGCGC UGCUUGACCC UACCCGCUUU UUCAACACUG
 7300 CGCAGGAAGU GGCUGGACUC CUUUUAAAAU UAGAGCAUAA UUAGUAAAUC
 7350 AUAAUUGGCU UAACCCUACC GCAUGAACCG AACUUGAUAA AAGUGCGGUA
 7400 GGGGUAAAUA CUCCGCAUUC GGUGCGG

ES 2 566 146 T3

Apéndice 2: SEQ ID NO: 2
 Secuencia del virus no modificado (nativa)

```

0   TTAAACAGC CTGTGGGTTG TTCCCACCA CAGGGCCAC TGGGCGCTAG
50  CACACTGGTA TCACGGTACC TTTGTGCGC TGTTTTATAT CCCCCTCCCC
100 ACTGTAACCT AGAGAAATCA CATAAACGAT CAATAGAAGG CGCAGCACAC
150 CAGCTGAGTC TTGACCAAGC ACTTCTGTTT CCCCAGACTG AGTATCAATA
200 GACTGCTCAC GCGGTTGAAG GAGAAAACGT TCGTTACCCG GCCAACTACT
250 TCGAGAAACC TAGTACCACC ATGAAAGTTG CGCAGTGTTT CGTCCAGCAC
300 AACCCAGTG TAGATCAGGT CGATGAGTCA CCGCATPCCC CACGGGCGAC
350 CGTGGCGGTG GCTGCGTTGG CGGCCTGCCT ATGGGGCAAC CCATGGGACG
400 CTTCAATACT GACATGGTGC GAAGAGTCTA TTGAGCTAGT TGGTAGTCTT
450 CCGGCCCTG AATGCGGCTA ATCCTAACTG CGGAGCAAGT GCCCACAAAC
500 CAGTGGGTAG CTTGTCGTAA CGGGCAACTC TGCAGCGGAA CCGACTACTT
550 TGGGTGTCCG TGTTCCTTT TATTCTTATT CTGGCTGCTT ATGGTGACAA
600 TTGAGAGATT GTTACCATAT AGCTATTGGA TTGGCCATCC GGTGACTAAC
650 AGAGCAATTA TATACCTCTT TGTGGATTT ATACCACTTA AT'TCCACTAA
700 TTACAACACT CTGCTACACA TTATTTACTT AAAACCAAGA AGATGGGAGC
750 ACAAGTATCA ACACAAAAAA CTGGTGACAA TGAGACCSGT TTGAGCGCTA
800 ACGGAAGCTC CATCATTAC TACACCAACA TCAATTACTA CAAAGATGCA
850 GCATCCAACT CAGCCAACAG GCAAGACTTC ACCCAAGATC CAGGCAAATT
900 CACCGAACCG GTCAAGGATA TCATGATCAA GTCAATGCC GCCCTAAACT
950 CACCGACCGT GGAGGAGTGT GGGTACAGTG ATAGGGTGAG ATCCATAACG
1000 CTCGGCAACT CAACCATTAC CACTCAGGAG AGTGCAAAATG TAGTTGTGG
1050 CTATGGCGGG TGGCCAGAGT ACTTGAAAGA TGAAGAAGCT ACTGCGGAAG
1100 ATCAACCAAC ACAACCCGAT GTAGCCACAT CGAGGTTTTA CACGCTGGAA
1150 TCCGTCCAGT GGGAGAAAAA TTCCGCTGGA TGGTGGTGGG AGTCCCCCGA
1200 AGCACTTAAG GACATGGGCC TC'TTTGGTCA AAACATGCAT TACCACATCC
1250 TCGGTAGAGC AGGCTACACT ATACACGTGC AGTGCAATGC ATCCAAATTC
1300 CACCAAGGCT GTCTACTTGT TGTCTGTGTA CCTGAGGCTG AGATGGGGTG
1350 TTCCAAAGTG GACGGTACTG TAAATGAGCA GGAATTGACG GAGGGTGAAA
1400 CGGATATGAA GCTTGAACCC ACCAGAACCA CAGGCCTACG CCGATGTCAA
1450 TCCGCAGTGT ACAACGCGGG TATGGGCGTC GGGGTGGGGA ACCTCACCAT
1500 CTTCCCTCAC CAGTGGATCA ACCTGCGCAC TAACAACGTG GCTACAATTG
1550 TGATGCCATA CATAAATAGT GTACCCATGG ATAACATGTT TAGGCATAC
1600 AACTTCACGC TAATGATGAT CCCATTTGCA CCCCTGGATT ACACCAACCA
1650 AGCATCTACG TACGTACCTA TAACTGTGAC AATAGCACCA ATGTGTGCTG
1700 AATACAATGG TTTGAGGCTC GTTACCTCGC AAGGGTTGCC AGTGTGTAAC
1750 ACACCGGGAA GCAATCAGTT CCTGACATCG GATGACTTTC AATCACCTTC
1800 GGCTATGCCA CAATTTGATG TGACTCCAGA CATGGACATC CCAGGTGAAG
1850 TGAACAACCT CATGGAGATT GCAGAGGTTG ACTCGGTGGT ACCTGTTAAC
1900 AACAATGAGG CCAATCTGAA AAGCATGGAC GCATACCGCA TACCGGTGAA
1950 CRCAGGAAAT CAACAAGGTG AAAAGATATT TGGTTTCCAA ATACAACCCG
2000 GGCTTGATTC AGTGTTTAAG AGAACACTGC TAGGTGAGAT GCTCAATTAT
2050 TACACGCACT GGTACGGGAG CATTAAGCTA ACATTTATGT TTTGTGGTTC
2100 AGCAATGGCC ACGGGCAAAT TACTCTTAGC ATACTCACCA CCTGGGCGCG
2150 ATGTACCGAC TAGCAGAAAG GAGGCAATGC TGGGAACCCA TGTCATCTGG
2200 GACTTTGGGC TGCAATCCAG TTGTGTTCTG TGTGTTCCAT GGATCAGCCA
2250 GACACACTAC AGGTTGGTGC AGCAGGATGA GTACACCGGC GCCGGCTATA
2300 TCACCTGCTG GTACCAAACA AGTATAGTGG TTCCACCCGG CACACCCAAA
2350 AAGTGTGTCA TCCTGTGCTT TGTGTCAGCG TGTAAATGATT TCTCCGTGAG
2400 CATGCTGAGT GACACACCAT TCATCGGCCA AACAGCACTG CTGCAGAGCC
2450 CTGTGGAAGA AGCTGAAGAG AACGCAGTTG CACGTGTGGC TGACACAATT
2500 GCCAGTGGGC CCAGCAACTC CGAGAGCGTT CCTGCACTAA CAGCAGTTGA
2550 GACTGGGCAC ACATCACAGG TAGTGCCTAG TGACACAATG CAAACAAGGC
2600 ATGTGAAGAA CTACCATTCC AGATCTGAGT CAACAATAGA GAACTTCCTT
2650 AGCAGGTCCG CCTGTGTGTA TATTGAAGAG TACTATACCA ACACTGAAAC
2700 CAGACAAAAT TTATACATGT TGCCCACTAT AAATACTAGA TGGATGGTGC
2750 AATTGAGGAG AAAGTTTGAAG ATGTTACAT ACATGAGGTT TGACATGGAA
2800 ATCACAATTTG TTATCACTAG TAGACAACCTG CATCGAACTA GCATCGCCGA
2850 GGACATGCCG GTACTGACAC ACCAAATCAT GSTATGTACCA CCTGGTGGTC
  
```

ES 2 566 146 T3

2900 CAGTACCAAA CAGTGTGGAC GATTACGCAT GGCAAACCTC GACTAACCCCA
 2950 AGTGTCTTTT GGACTGAGGG CAATGCCCCA CCGCGTATGT CCATACCATT
 3000 CATAAGCATA GGGAAATGCAT ACAGCAACTT TTATGATGGG TCCTCGCACT
 3050 TCTTACAATA TGGGGTATAT GGCTACAACA CATTAAACAA CATGGGGAAA
 3100 TTATACGTAC GCCATGTGAA CAACCACACA CCATACCAAA TGACCAGTAC
 3150 GGTTAGTGTG TACTTTAAAC CCAAACATGT CAGAGCGTGG GTGCCGAGAC
 3200 CACCACGTCT GTGCCOCTAC AAAAATGCAT GGAACGTAA CTTTGAAACCA
 3250 ACAAACGTAA CTGATTCAAG ATCAAGTATC ACATATATTC CTGAGACGGT
 3300 CAAACCAGAC CTATCAAAAAG CTGGAGCTTT CGGCCACCAG TCCGGTGTCTG
 3350 TTTATGTGGG TAACTACAGA GTGGTGAATA GGCACCTCGC CACGCACAAC
 3400 GACTGGCAAA ACTGTGTGTG GGAAGACTAC AACAGAGACC TCCTTGTGAG
 3450 CACCACCACA GCCCATGGGT GTGACCCAT AGCCAGATGC CAGTGCACAA
 3500 CAGGCGTGTG CTTTTGTGCC TCAAGSAACA ABCACTACCC AGTCACCTTT
 3550 GAGGGCCAG GCCTGGTGGG AGTTCAGGAG AGTGAGTACT ACCCAAAAAG
 3600 ATACCAATCC CATGTGCTTC TAGCTGCAGG ATTTTCTGAA CCAGGCGATT
 3650 GTGGTGAAT CCTCAGGTGT GAACATGGTG TCATCGGTAT CGTCACCATG
 3700 GGTGGAGAGG GGGTCGTTGG GTTTGCCGAC GTCCGAGACC TACTGTGGTT
 3750 AGAGGATGAT GCCATGCAAC AGGCCGTAAG AGACTATGTT GAACAACCTAG
 3800 GAAATGCTTT TGGCTCAGGT TTCACCAACC AAATTTGTGA ACAAGTCAAC
 3850 CTCCTCAAAG AGTCACTGGT TGGACAGGAC TCCATTCTGG AGAAATCCCT
 3900 TAAAGCCCTA GTTAAGATTA TCTCAGCACT GGTCATTGTA GTGAGAAATC
 3950 ACGATGACCT CATCAGATG ACTGCCACTC TAGCCCTCAT TGGTTGCACC
 4000 TCTTCTCCAT GGGCGTGGCT CAAACAGAAA GTGTCACAA ATTATGGAAT
 4050 ACCCATGGCT GAGCGACAAA ACAATGGCTG GCTCAAGAAG TTCACTGAGA
 4100 TGACCAATGC CTGCAAGGGC ATGGAGTGA TAGCCATCAA AATTCAAAAA
 4150 TTTATTGAGT GGCTTAAAGT CAAGATCTAC CAGAAGTGTG GGA AAAACAT
 4200 GAGTTCCTCA ACAGACTATA ACAACTACCA CTCTTGGAAG AGTCAGATTG
 4250 CCACCATAGA ACAAAAGTGCA CCATCGCAGA GTGACCAGGA GCAACTGTTT
 4300 TCCAATGTCC AGTACTTCGC CCACTATTGC AGAAAGTATG CGCCACTGTA
 4350 TGCAGCTGAG GCAAAGAGAG TGTCTCCCT TGAGAAGAAA ATGAGCAATT
 4400 ACATACAGTT CAAGTCCAAA TGCCGTATTG AGCCTGTAIG TTTGCTCNTA
 4450 CATGGCAGCC CAGGGGCCGG AAAATCCGTG GCCACCAACC TGATTGGCAG
 4500 ATCACTCGCT GAAAACTCA ACAGCTCAGT GTACTCCCTA CCACCAGACC
 4550 CAGATCACTT TGATGGCTAC AAACAGCAAG CGGTCGTGAT CATGGATGAT
 4600 CTATGCCAAA ATCCTGATGG AAAAGATGTG TCATTGTTCT GTCAAAATGGT
 4650 TICCAGTGTG GACTTTGTAC CACCGATGGC TGCCTAGAG GAGAAAAGCA
 4700 TICTGTTCAC CTCCCCTTTT GTCTTGGCAT CAACCAATGC TGGGTCCATC
 4750 AATGCACCAA CTGTGTCAGA CAGCAGAGCC CTCGCTAGGA GATTCCACTT
 4800 TGACATGAAC ATTGAAGTCA TTTCCATGTA CAGTCAAAAT GGCAAGATCA
 4850 ACATGCCCCA CTCAGTTAAG ACGTGTGATG AAGAGTCTTG TCCAGTCAAC
 4900 TTCAAGAGGT GCTGCCCGCT GGTGTGTGGA AAGGCCATGC AGTTCAATGA
 4950 CAGAAGAACT CAAGTTAGAT ACTCGCTGGA CATGCTAGTT ACTGAGATGT
 5000 TTAGGGAGTA CAACCACAGA CACAGTGTGG GAGCCACCCT TGAGGCTCTG
 5050 TTCCAAGGGC CACCAGTCTA CAGAGAGATC AAAATTAGTG TCGACCAGA
 5100 GACACCACCA CCACCAGCTA TTGCTGACTT ACTGAAATCA GTGGACAGTG
 5150 AAGCTGTGAG AGAGTACTGC AAAGAAAAGG GATGGCTTGT GCCAGAGATC
 5200 AACTCCACCC TACAAATTGA GAAGCATGTG AGCCGGGCAT TCATCTGTCT
 5250 GCAAGCACTA ACCACGTTTG TTTCAAGTGC TGAATAATA TACATTATTT
 5300 ACAAGCTATT TGCAGGTTTC CAAGGCGCAT ACACAGGGAT GCCCAACCAG
 5350 AAACCCAAGG TGCCCACCCCT GAGACAAGCC AAAAGTGCAAG GCCCAGCGTT
 5400 TGAGTTTGCT GTGGCGATGA TGAAGAGGAA CTCCAGTACA GTGAAAACCG
 5450 AGTACGGTGA GTTCACCATG CTGGCATTG ATGACAGGTG GGGCGTGTTA
 5500 CCACGCCACG CCAAACCTGG CCCAACCATC TTGATGAATG ACCAGGAAGT
 5550 CGGCGTGTG GATGCCAAGG AACTAGTGGG TAAGGATGGG ACAACCTAG
 5600 AACTGACACT CCTGAAGCTC AACAGTAAATG AGAAGTTGAG AGACATCAGA
 5650 GGGTTCTTAG CCAAAGAAGA GGTGTGAGGTG AATGAAGCTG TCCTAGCAAT
 5700 AAACACAAGC AAGTTCCCCA ACATGTACAT ACCAGTGGGC CAGGTGACTG
 5750 ACTACGGGTT CCTGAACCTG GGTGGGACGC CCACTAAGAG AATGCTCATG
 5800 TACAACCTTC CCACTAGAGC AGGTCAAGTGT GGTGTGTCTC TCATGTCCAC
 5850 TGGGAAAGTC CTGGGATAC ATGTTGGTGG GAATGGTCAAT CAAGGGTTCT
 5900 CAGCAGCACT CCTCAAGCAC TACTTCAACG ATGAACAAGG TGAATAGAG
 5950 TTCATTGAGA GCTCAAAGGA CGCGGGTTC CCTATCATCA ACACACCAG
 6000 CAAGACCAAA CTGGAACCAA GTGCTTCCA CCAGTGTTCG AAGGCAACAA
 6050 AGAACCCAGC AGTCCTCAGA AATGGTGTAT CACCACTCAA AGCCAACTTT
 6100 GAGGAGGCCA TCTTCTCCAA ATACATTGGC AATGTCAACA CGCATGTGGA
 6150 TGAGTACATG TTGGAAGCTG TGGACCATTA TGCAGGACAA CTGGCTACTC
 6200 TGGACATCAG CACGGAACCA ATGAAGCTGG AGGATGCCGT GTATGGTACA
 6250 GAGGGGCTGG AAGCACTAGA CCTAACCAAC AGTGCAGGCT ACCCTTATGT

ES 2 566 146 T3

```
6300 TGCCCTGGGC ATCAAGAAGA GAGACATCCT ATCTAAGAAG ACCAGGGACC
6350 TCACTAAGTT GAAAGAATGC ATGGACAAGT ATGGCCTAAA CCTGCCAATG
6400 GTAACCTATG TGAAAGATGA GCTCAGATCT GCAGAGAAGG TGGCCAAAGG
6450 AAAATCCAGG CTTATTGAAG CTCCAGTTC GAATGACTCA GTGGCAATGA
6500 GACAGACATT TGGAAACCTG TACAAAACCT TCCACCTCAA CCCAGGCATT
6550 GTGACGGGCA GTGCAGTTGG GTGTGACCCA GATCTGTTTT GGAGCAAGAT
6600 ACCAGTCATG TTGGATGGAC ATCTCATAGC TTTTGATTAC TCAGGCTATG
6650 ATGCTAGCCT CAGCCCAGTG TGGTTTGCAT GTCTGAAACT GCTCCTAGAG
6700 AAGCTTGGGT ACACACACAA GAAACAAC TACATAGATT ACCTCTGCAA
6750 CTCCCACCAC CTGTACAGAG ACAAACACTA CTTTGTGCGA GGTGGTATGC
6800 CATCAGGGTG TTCTGGCACC AGCATCTTTA ACTCAATGAT TAACAACATC
6850 ATAATCAGGA CACTCATGCT GAAAGTGTAC AAGGGCATTG ACTTGGACCA
6900 ATTCAGGATT ATTGCCTATG GTGATGATGT GATTGCTTCC TACCCGTGGC
6950 CCATTGATGC TTCCTGCTA GCTGAAGCAG GAAAAGATTA TGGTTTGATC
7000 ATGACACCAG CAGATAAAGG AGAGTGCTTC AATGAAGTCA ACTGGACGAA
7050 TGTCACCTTC CTGAAAAGGT ACTTTAGAGC AGATGAGCAA TACCCATTCC
7100 TGGTCCACCC TGTATGCCC ATGAAAGACA TCCATGAATC TATTAGATGG
7150 ACCAAAAGATC CAAAGAACAC CCAAGATCAT GTGCGCTCGC TGTGCCTATT
7200 GGCTTGGCAC AATGGGGAGC ACGAATATGA GGAGTTCATT CGCAAAATCA
7250 GAAAGCGTGC CAGTTGGACG CTGTTTGACC CTACCTGCGT TTTCAACCTT
7300 GCGCAGGAAG TGGTTGGACT CCTTTTAAAA TAAAGCACAA TTTAGTAAAT
7350 TTGAATTGGC TTAACCCTAC CGCACTAACC GAACTAGATA ACGGTGCGGT
7400 AGGGGTAAT TCTCCGCATT CGGTGCGGTC GAGG
```

Apéndice 3: SEQ ID NO: 3

Secuencia del virus modificado después de la propagación durante 12 meses

5

ES 2 566 146 T3

0 UUAAAACAGC CUGUGGGUUG UUCCCACCCA CAGGGCCCAC UGGGCGCUAG
 50 CACACUGGUA UCACGGUACC CUUGUGCGCC UGUUUUAUCU UCCCCUCCCC
 100 ACUGUAACUU AGAAGAAUGA CAUAAAACGGU CAACAGAUAG CUCAGUACAC
 150 CAACUGAGCC CCGACCAAGC ACUUCUGUUA CCCC GGACCG AGUAACAAUA
 200 GGCUGCUCGC GCGGCUGAAG GUGAAAACGU UCGUUACCCG GCCAAUUACU
 250 UCGAGAAACC UAGUACCACC AUGAAGGUUG CGCAGCGUUU CGCUCCGCAC
 300 AACCCAGUG UAGAUCAGGU CGAUGAGUCA CCGCACUCCC CACGGGCGAC
 350 CGUGGCGGUG GCUGCGCUGG CGGCCUGCCU AUGGGGCAAC CCAUGGGACG
 400 CUUCAAUACU GACAUGGUGC GAAGAGUCUA UUGAGCUAAU UGGUAGUCCU
 450 CCGGCCCCUG AAUGCGGCUA AUCCUAACUG CGGGGCAAGU GCCCACAAC
 500 CAGUGGGUGG CUUGUCGUAA CGGGUAACCC UGCAGCGGAA CCGACUACUU
 550 UGGGUGUCCG UGUUUCCUUU UAUUCUUAU CUGGCUGCUU AUGGUGACAA
 600 UUGAGAGAUU GUUGCCAUAU AGCUAUUGGA UUGGCCAUCU GGUGAGUAAC
 650 AGAGCAAUCA UAUUCCUCUU UGUUGGAUUU AUACCACUUG AUUCCACUAG
 700 UUACAACACU CUGCUACAUA UUAUUUGCUU AAAUACAAGA AGAUGGGAGC
 750 ACAAGUAUCG ACACAAAAGA CUGGUGCACA CGAGACCGGU UUGAGCGCUA
 800 ACGGACACUC UAUCAUUCAC UAUACCAACA UCAACUACUA CAAAGAUGCA
 850 GCAUCCAACU CAGCCAACAG GCAGGAUUUC ACCCAGGAUC CAGGUAAGUU
 900 CACUGAACCG GUCAAGGAUA UCAUGAUCAA AUCGAUGCCC GCCCUAAACU
 950 CACCGUCCGC GGAGGAGUGC GGGUACAGCG ACAGGGUGAG AUCCCUAACG
 1000 YUCGGCAACU CAACCAUUAC CACUCAAGAA AGUGCAAACG UAGUUGUUGG
 1050 CUAUGGCAGG UGGCCAGAGU ACUUGAAAAGA UGAAGAAGCU ACUGCGGAAG
 1100 AUCAGCCAAC ACAACCCGAU GUAGCCACAU GCAGGUUCUA CACGUUGGAA
 1150 UCCGUCCAGU GGGAGAAAAA UAGCGCUGGA UGGUGGUGGA AGUUCCCCGA
 1200 AGCACUUAAG GACAUGGGCC UCUUUGGUCA GAACAUGCUU UACCACUAUC
 1250 UCGGUAGAGC AGGCUACACU AUACAUGUGC AGUGCAACGC AUCCAAUUU
 1300 CAUCAGGGCU GUCUACUUGU UGUCUGUGUA CCUGAAGCUG AGAUGGGGUG
 1350 UUCCCAGACG GACAAAGAGG UUGCUGCGAU GAACCUCACG AAGGGUGAAA
 1400 CGGCGCACAA GUUUGAACCA ACCAAAACCA CAGGCGGCCA CACAGUGCAA
 1450 UCCAUAGUGU GCAACGCGGG UAUGGGCAUC GCGUGGGGA ACCUCACCAU
 1500 CUACCUCAC CAGUGGAUCA ACUUGCGCAC UAAUAACUGC GCUACAAUUG
 1550 UGAUGCCGUA UAUAAAUUCA GUACCCAUUG AUAACAUGUU UAGGCACUAC
 1600 AAUUUCACGC UAAUGGUGAU CCCAUUUGCA CCCCUGGAUU ACAUGCCCA
 1650 AGCAUCUGAG UACGUACCUG UAACUGUCAC AAUAGCCCCA AUGUGUGCAG
 1700 AAUACA AUGG UUURAGGCUG GCUUACCAGC AAGGGCUGCC AUGUCUAAAU
 1750 ACACCGGGAA GCAAUCAGUU UAUGACAUCG GAUGAUUUUC AAUCCCUUC
 1800 GGCUAUGCCA CAAUUUGAUG UGACUCCGCA CAUGGACAUC CCAGGUGAAG
 1850 UGCACAACCU CAUGGAGAUU GCAGAAGUUG AUUCGGUGGU ACCUGUUAAC
 1900 AACACUGCGG CCAAUCUGCA AAGCAUGGAC GCAUAUCACA UAGAGGUGAA
 1950 CGCAGGAAAU CACCAAGGUG AAAAGAUUU CGCUUUCAG AUACAACCCG
 2000 GGCUGGAUUC AGUGUUUAAG AGAACACUGC UAGGUGAAGU GCUCAAUUUU
 2050 UACGCGCACU GGUCAGGGAG CAUUAAGCUA ACAUUCACAU UUUGUGGUUC
 2100 AGCAAUGGCC ACGGGCAAGC UACUCUUAGC AUACUCCCCA CCUGGCGCCG
 2150 AUGUACCGGC UAGCAGAAAG CAGGCAAUGM UGGGAACCCA UAUCAUCUGG
 2200 GACUUAGGGC UGCAAUCCAG UUGCGUUCUA UGUUUCCA UGGAUCAGUCA
 2250 GACACAUUAU CGCCUAGUGC AACAGGAUGA GUACACCAGC GCCGGCAAUG

ES 2 566 146 T3

2300 UCACCUGCUG GUAUCAGACA GGUUAGUGG UUCCACCCGG CACACCCAAC
 2350 AAGUGUGUCG UCCUGUGCUU UGUGUCAGCG UGUAAUGACU UCUCGGUGCG
 2400 CAUGCUGCGU GACACACCAU UCAUCGGCCA AACAAACACUG CUACAAGGUG
 2450 AUACGGACGU GGCCGUCAAC AAUGCAGUAG CCAGGGUAGC UGAUACAAUU
 2500 GCCAGUGGGC CCAGCAACUC CACUAGCAUU CCUGCACUAA CCGCAGUUGA
 2550 GACUGGGCAC ACAUCACAGG UAGAGCCUAG UGAUACAAUG CAAACACGGC
 2600 AUGUAAAGAA CUACCAUUCG CGAUCUGAAU CAACAAUAGA GAACUUCUUU
 2650 AGCCGGUCGG CCUGUGUAUA UWUUGAAGAS UACUUUACCA AAGAUCAAGA
 2700 CAGCGCCAAU AGGUACAUGU CAUGGACUUA AAAUGCUAGA AGGAUGGUGC
 2750 AAUUGAGGGC AAAGUUUGAA CUGUUCACAU ACAUGCGGUU UGAUUGGGAG
 2800 AUCACAUUUG UUAUCACUAG UAGACAACUG CCUGGGACUA GCAUCGCGCA
 2850 AGACAUGCCG CCACUGACAC ACCAAAUCAU GUUAUACCC CCUGGUGGUC
 2900 CARUACCAA CAGUGUGACC GAUUUUGCAU GGCAAACUUC GACUAAUCCA
 2950 AGUAUCUUUU GGACUGAGGG CAAUGCCCCC CCGCGUAUGU CCAUACCAUU
 3000 UAUAAAGCAUA GGGAAUGCAU ACAGCAACUU UUAUGACGGA UGGUCGCACU
 3050 UCUCACAAA UGGGGUAUAC GGCUACAAUG CAUUAACAA CAUGGGCAAA
 3100 UUAUACGCAC GCCAUGUGAA CAAAGACACA CCGUACCAGA UGUCCAGUAC
 3150 GAUUCGUGUG UACUUUAAAC CAAACAUUU CAGAGUGUGG CUGCCAAGAC
 3200 CACCACGUUU GUGCCCCUUA AUUAAAUCUA GUAACGUUAA CUUUGACCCA
 3250 ACCAACCUA CUGAUUCAAG AUCAAUUAU ACAUUGUGC CAGACACUUA
 3300 CCGUCCGGAA GUCCGUACAG CUGGAAAAUU CCGCCACCAG UCCGGUGGUC
 3350 UUUACGUGGG UAAUACAGA AUAGUGAACA GGCACCUCGC CACGCACAAC
 3400 GACUGGCAA ACUGUGUGUG GGAAGACUAC AACAGAGACC UCCUUGUGAG
 3450 CACCACUACA GCCCAUGGGU GUGACACUUA AGCCAGAUGU CAGUGCACAG
 3500 CAGGCGUAUA UUUUUGUGCC UCAAGGAACA AACAUUACCC AGUCACCUUC
 3550 GAGGGGCCAG GCUUGGUGGA AGUUCAGGAG AGCGAGUACU ACCCAAAAAG
 3600 AUUACAGUCC CACGUGCUUC UAGCUGCAGG AUUUUCUGAA CCGGGCAUUA
 3650 GUGGCGGAAU CCUCAGAUGU CAACACGGCG UGAUCGGUUA CGUACCAUUG
 3700 GGUGGAGAGG GGGUCGUUGG GUUUGCCGAC GUCAGAGACC UACUGUGGUU
 3750 AGAGGAUGAU ECCAUGGAAC AGGGCGUAAG AGACUAUGUU GAACAACUAG
 3800 GAAUUCUUU CGGCUCAGGU UUCACCAAUC AAAUUUGUGA ACAGGUCAAC
 3850 CUCCUCAAG AGUCAUUGGU UGGACAGGAU UCUAUUCUGG AAAAAUCCCU
 3900 UAAGGCUCUA GUUAAGAUUA UCUCAGCACU GGUCGUUGUA GUGAGAAUUC
 3950 ACGAUGAUCU CAUAACGGUU ACCGCCACUC UAGCUUUAU UGGUUGCACC
 4000 UCUUCUCCGU GCGGUGGCU CAAGCAGAAG GUGUCACAAU AUUAUGGAAU
 4050 ACCCAGGGCC GAGCGACAAA ACAAUAGCUG GCUCAAGAAG UUUACUGAGA
 4100 UGACCAACGC CUGCAAGGGC AUGGAGUGGA UAGCCAUAAA AAUUCAAAAG
 4150 UUUUUGAGU GGCUUAAAAGU CAAGAUUCUG CCGGAAGUGA AGGAAAAACA
 4200 CGAGUUCUUC AACAGGCUAA AGCAAUACC ACUCCUAGAG AGCCAGAUUG
 4250 CAACCAUAGA GCAGAGUGCA CCAUCGCAGA GUGAUCAAGA GCAACUCUUC
 4300 UCCAACGUCC AGUACUUCGC CCAUUAUUGC AGAAAGUAUG CGCCAUUGUA
 4350 CGCUGCCGAG GCGAAGAGAG UGUUCUCACU UGAGAAGAAA AUGAGCAACU
 4400 ACAUACAGUU CAAGUCCAAA UGCCGUUUG AGCCUGUUG CUUACUCCUA
 4450 CAUGGCAGCC CAGGGGCCGG AAAGUCCGUG GCCACCAACU UGAUUGGCAG
 4500 AUCCUCGCA GAAAAACUCA ACAGCUCUGU AUACUCCUA CCACCAGACC
 4550 CCGACCACUU UGACGGCUAC AAGCAGCAAG CGGUCGUGAU CAUGGAUGAC
 4600 UUAUGCCAAA AUCCUGAUGG AAAAGAUGUC UCACUAUUU GUCAGAUGGU
 4650 UUCUAGCGUG GACUUUGUAC CACCGAUGGC UGCGUJAGAG GAAAAAGGAA
 4700 UCCUAUUUAC CUCCCCGUUC GUGUUGGCAU CAACCAACGC UGGGUCCAUC
 4750 AAUGCACCCA CUGUGUCUGA CAGCAGAGCG CUCGCJAGGA GAUUCACUU
 4800 UGACAUGAAC AUUGAAGUCA UUUCUAUGUA CAGUCAAAAC GGCAAGAUCA
 4850 ACAUGCCCAU GUCAGUAAA ACAUGUGAUG AAGAGUGUUG UCCAGUUAAC
 4900 UUCAAAAAGG GUCUGCCGUU GGUGUGUGGG AAGGCYAUGC AAUUCAUUGA

ES 2 566 146 T3

4950 UAGGAGAACU CAAGUUAGAU AUUCGUGGA CAUGCUAGUJ ACUGAAAUGU
 5000 UUAGGGAGUA UAACCAUAGA CACAGUGUGG GAGCCACUCU UGAAGCUCUG
 5050 UUCCAAGGGC CACCAGUCUA CAGAGAGAUC AAAAUCAGCG UCGCCCCAGA
 5100 GACACCCCA CCACCAGCUA UUGCUGAUUU ACUGAAAUCA GUGGACAGUG
 5150 AAGCUGUGAG GGAUACUGC AAGGAGAGAG GGUGGCUUGU GCCAGAGAUC
 5200 AAUUCUACCC UACAAAUAGA GAAGCAUGUG AGUAGAGCAU UCAUAUGUUU
 5250 ACAAGCCUA ACCACGUUUG UUUCAGUUGC UGGUUAUAUA UACAUUAUUU
 5300 ACAAUUUAUU UGCAGGUUUC CAAGGCGCCU ACACAGGGAU GCCCAACCAG
 5350 AAACCUAAGG UGCCCACCCU GAGACAGGCC AAAGUACAGG GCCCAGCGUU
 5400 UGAGUUCGCU GUGGCGAUGA UGAAAAGGAA CGCCAGUACA GUAAAAACCG
 5450 AGUACGGUGA AUUCACCAUG CUUGGCAUUU ACGACAAGUG GGCGGUGUUA
 5500 CCGCGCCACG CCAAGCCUGG CCCACCAUC UUGAUGAAUG AUCAGGAAGU
 5550 CGGCGUGUUG GAUGCCAAGG AACUAGUUGA UAAAGAUGGG ACAAAUCUAG
 5600 AAUUGACUCU CCUGAAGCUC AACCGUAACG AAAAGUUCAG AGAUUUUAGG
 5650 GGGUUUCUAG CAAGAGAAGA GGUUGAAGUG AAUGAAGCUG UCCUAGCAAU
 5700 AAUJACAAGC AAUUCUUUA ACAUGUACAU ACCAGUGGGC CAGGUGACUG
 5750 ACUACGGGUJ UCUGAACCG GAGGAGACUC CCACGAAGAG AAUGCUAUG
 5800 UAUAAAUUCC CAACUAGAGC AGGUCAGUGU GGAGGUGUCC UCAUGUCAAC
 5850 AGGGAAAGUC CUGGGAAUAC AUGUAGGAGG GAAUGGACAU CAAGGGUUUC
 5900 CAGCGGCACU CCUCAGGCAC UACUUAACG AGGAGCAGGG UGAAAUAGAA
 5950 UUCAUUGAGA GCUCAAGGA CGCGGGAUUC CCUGUGAUCA ACACUCCCAG
 6000 UAAGACAAAA UUGGAACCAA GUGUGUUUCA CCAGGUGUUC GAGGGCAACA
 6050 AGGAACCAGC GGUCCUUAGA AAUGGGGACC CACGACUCA AGCCAACUUC
 6100 GAGGAAGCAA UCUUCUCCAA GUACAUUGGC AAUGUCAACA CGCAUGUAGA
 6150 UGAGUACAUG UUGGAGGCUG UGGACCAUUA UGCAGGACAA CUAGCUACUC
 6200 UGGACAUCAG JACGGAGCCC AUGAAGCUAG AGGACGCCGU GUAUGGUACA
 6250 GAGGGGUCUG AAGCACUAGA CUAACCACC AGUGCAGGCU ACCCUUACGU
 6300 GGCCUUGGGC AUCAAGAAA GAGAUUUUCU AUCUAAGAAG ACUAAAGACC
 6350 UCACUAAGUU GAAGGAAUGC AUGGACAAAU AUGGCCUAAA UUUGCCAAUG
 6400 GUAACCUACG UCAAAGAUGA GUUGAGAUCU GCUGAGAAGG UGGCCAAGGG
 6450 AAAAUCCAGG CUUAUUGAGG CUUCUAGUCU CAAUGACUCA GUAGCAAUGA
 6500 GGCAAACAUU UGGAAAUUUA UAUAAAGACCU UUCACCUCAA CCCGGGCAUC
 6550 GUUACGGGCA GUGCUGUUGG GUGUGAUCCA GAUGUGUUUU GGAGCAAGAU
 6600 CCCUGUUUUG CUUGAUGGAC AUCUCAUAGC UUUUGACUJU UCAGGCUAUG
 6650 ACUCUAGCCU CAGCCCAGUG UGGUUUGCAU GUUUGAAACU UCUCUAGAG
 6700 AAACUAGGGU AUACAAACAA GGAAACAAAC UACAUAGAUU ACCUCUGUAA
 6750 UUCCCAUCAC CUGUAUAGAG ACAAGCACUA CUUUGUAAGA GGCGGUAUGC
 6800 CAUCAGGGUG UUCAGGCACC AGCAUAUUUA AUUCCAUGAU UAACAACAUC
 6850 AUAAUCAGGA CUCUCAUGCU GAAGGUUUUA AAAGGCAUUG AUUUGGACCA
 6900 AUUCAGAAUG AUUGCCUAG GGAUGAUGU GAUUGCUUCC UAUCGUGGC
 6950 CUAUCGAUGC UUCGCGUUA GCUGAAGCAG GAAAAGAUUA UGGUUUAAUC
 7000 AUGACCCAG CAGACAAAGG CGAGUGCUUC AACGAGGUAA CCUGGACGAA
 7050 UGUGACCUUU CUGAAAAGGU ACUUUAGGGC AGAUGAGCAA UACCCAUUUC
 7100 UGGUCCAUC UGUUAUGCCA AUGAAGGACA UACAUGAGUC CAUUAGGUGG
 7150 ACCAAAGAUC CCAAGAACAC ACAGGAUCAU GUGCGCUCGC UGUGCCUUAU
 7200 GGCUUGGCAC AACGGGGAGC AAGAAUAUGA GGAGUUUAUU CGCAAGAUCA
 7250 GAAGCGUGCC CGUUGGGCGC UGCUUGACCC UACCCGCUUU UUCAACACUG
 7300 CGCAGGAAGU GGCUGGACUC CUUUUAAAAU UAGAGCAUAA UUAGUAAAUC
 7350 AUAAUUGGCU UAACCCUACC GCAUGAACCG AACUUGAUAA AAGUGCGGUA
 7400 GGGGUAAAUU CUCCGCAUUC GGUGCGG

ES 2 566 146 T3

Apéndice 4: SEQ ID NO: 4

Comparación de genomas del virus no modificado (nativo) y del virus modificado

N: virus no modificado (nativo)

M: virus modificado

5

```

1                                     50
N TTAAACAGC CTGTGGGTTG TTCCCACCCA CAGGGCCCAC TGGGCGCTAG
M .....

51                                     100
N CACACTGGTA TCACGGTACC TTTGTGCGCC TGTTTTATAT CCCCTCCCC
M ..... C..... C. T.....

101                                    150
N ACTGTAAC TT AGAGAAATCA CATAAACGAT CAATAGAAGG CGCAGCACAC
M ..... AG...G. ....G. ...C...TA. .T...T...

151                                    200
N CAGCTGAGTC TTGACCAAGC ACTTCTGTTT CCCCGGACTG AGTATCAATA
M ..A.....C. CC..... A .....C. ....A.....

201                                    250
N GACTGCTCAC GCGGTTGAAG GAGAAAACGT TCGTTACCCG GCCAACTACT
M .G.....G. ....C..... .T..... T....

251                                    300
N TCGAGAAACC TAGTACCACC ATGAAAGTTG CGCAGTGTTT CGCTCAGCAC
M ..... G.... C.... C....

301                                    350
N AACCCAGTG TAGATCAGGT CGATGAGTCA CCGCATTCCC CACGGGCGAC
M ..... C.....

351                                    400
N CGTGGCGGTG GCTGCGTTGG CGGCCTGCCT ATGGGGCAAC CCATGGGACG
M ..... C....

401                                    450
N CTTCAATACT GACATGGTGC GAAGAGTCTA TTGAGCTAGT TGGTAGTCCT
M ..... A.

451                                    500
N CCGGCCCTG AATGCGGCTA ATCCTAACTG CGGAGCAAGT GCCCACAAC
M ..... G.....

501                                    550
N CAGTGGGTAG CTTGTCGTAA CGGGCAACTC TGCAGCGGAA CCGACTACTT
M .....G. ....T...C. ....

551                                    600
N TGGGTGTCCG TGTTTCCTTT TATTCTTATT CTGGCTGCTT ATGGTGACAA
M .....

601                                    650
N TTGAGAGATT GTTACCATAT AGCTATTGGA TTGGCCATCC GGTGACTAAC
M .....R..... R..T .....G....

```

ES 2 566 146 T3

```

651                                     700
N AGAGCAATTA TATACCTCTT TGTTGGATTT ATACCACTTA ATTCCAATAA
M .....C. ...T..... .....G .....G

701                                     750
N TTACAACACT CTGCTACACA TTATTTACTT AAAACCAAGA AGATGGGAGC
M .....T. ....G... ...TA..... .....

751                                     800
N ACAAGTATCA ACACAAAAAA CTGGTGCACA TGAGACCSGT TTGAGCGCTA
M .....G .....G. ....C..... .....

801                                     850
N ACGGAAGCTC CATCATTAC TACACCAACA TCAATTACTA CAAAGATGCA
M .....CA... T..... ..T..... ....C..... .....

851                                     900
N GCATCCAAC T CAGCCAACAG GCAAGACTTC ACCCAAGATC CAGGCAAATT
M .....T..... .....G..T... .....G.... ....T..G..

901                                     950
N CACCGAACCG GTCAAGGATA TCATGATCAA GTCAATGCCC GCCCTAAACT
M ...T..... .....A..G..... .....

951                                     1000
N CACCGACCGT GGAGGAGTGT GGGTACAGTG ATAGGGTGAG ATCCATAACG
M .....T...C .....C .....C. .C..... ....C.....

1001                                     1050
N CTCGGCAACT CAACCATTAC CACTCAGGAG AGTGCAAATG TAGTTGTTGG
M .....A..A .....C. ....

1051                                     1100
N CTATGGCGGG TGGCCAGAGT ACTTGAAAGA TGAAGAAGCT ACTGCGGAAG
M .....A.. .....

1101                                     1150
N ATCAACCAAC ACAACCCGAT GTAGCCACAT GCAGGTTTTA CACGCTGGAA
M ....G..... .....R. ....C. ....T.....

1151                                     1200
N TCCGTCCAGT GGGAGAAAAA TTCCGCTGGA TGGTGGTGA AGTTCCCCGA
M .....AG..... .....

1201                                     1250
N AGCACTTAAG GACATGGGCC TCTTTGGTCA AAACATGCAT TACCACTACC
M .....G..... .....T. ....T. ....T.

1251                                     1300
N TCGGTAGAGC AGGCTACACT ATACACGTGC AGTGCAATGC ATCCAAATTC
M .....T..... .....C. ....T

1301                                     1350
N CACCAAGGCT GTCTACTTGT TGCTGTGTA CCTGAGGCTG AGATGGGGTG
M ..T..G.... .....A..... .....

1351                                     1400
N TTCAAAGTG GACGGTACTG TAAATGAGCA GGAATTGACG GAGGGTGAAA
M ....C.GAC. ...AAAGAG. .TGC..C.AT .A.CC.C... A.....

1401                                     1450

```

ES 2 566 146 T3

```

N CGGATATGAA GCTTGAACCC ACCAGAACCA CAGGCGTACG CCGAGTGCAA
M ...CGCAC.. .T.....A ....A..... .....GC.A .AC.....

1451 1500
N TCCGCAGTGT ACAACGCGGG TATGGGCGTC GCGGTGGGA ACCTCACCAT
M ...AT..... G.....A..... .....

1501 1550
N CTTCCCTCAC CAGTGGATCA ACCTGCGCAC TAACAACGTG GCTACAATTG
M ..A..... ..T..... ..T.....C .....

1551 1600
N TGATGCCATA CATAAATAGT GTACCCATGG ATAACATGTT TAGGCACTAC
M .....G.. T.....TCA .....

1601 1650
N AACTTCACGC TAATGATGAT CCCATTTGCA CCCCTGGATT ACACCAACCA
M ..T..... ..G..... ..ATGC...

1651 1700
N AGCATCTACG TACGTACCTA TAACTGTACAC AATAGCACCA ATGTGTGCTG
M .....GA. ....G..... ..C... ..A.

1701 1750
N AATACAATGG TTTGAGGCTC GTTACCTCGC AAGGGTTGCC AGTGATGAAC
M .....A.....G .C.TA.CA.. .....C.... ..C.A..T

1751 1800
N ACACCGGAA GCAATCAGTT CCTGACATCG GATGACTTTC AATCACCTTC
M ..... TA..... ..T.... ..C.....

1801 1850
N GGCTATGCCA CAATTTGATG TGACTCCAGA CATGGACATC CCAGGTGAAG
M .....GC. ....

1851 1900
N TGAACAACCT CATGGAGATT GCAGAGGTTG ACTCGGTGGT ACCTGTTAAC
M ..C..... ..A..... .T.....

1901 1950
N AACCAATGAGG CCAATCTGAA AAGCATGGAC GCATACCGCA TACCGGTGAA
M ...C..C.. .....C. ....T.A.. ..GA.....

1951 2000
N CRCAGGAAAT CAACAAGGTG AAAAGATATT TGGTTTCCAA ATACAACCCG
M .....C..... C.C.....G .....

2001 2050
N GGCTTGATTC AGTGTTTAAG AGAACACTGC TAGGTGAGAT GCTCAATTAT
M ...G..... ..AG. ....

2051 2100
N TACACGCACT GGTCAAGGAG CATTAAAGCTA ACATTTATGT TTTGTGGTTC
M ...G..... ..C.CA. ....

2101 2150
N AGCAATGGCC ACGGGCAAAT TACTCTTAGC ATACTCACCA CCTGGCGCCG
M .....GC .....C...

2151 2200

```

ES 2 566 146 T3

N ATGTACCGAC TAGCAGAAAG GAGGCAATGC TGGGAACCCA TGTCATCTGG
MG.C...AA.....

2201 2250
N GACTTTGGGC TGCAATCCAG TTGTGTTCTG TGTGTTCCAT GGATCAGCCA
MA....C.....A ...A.....T..

2251 2300
N GACACACTAC AGGTGGTGC AGCAGGATGA GTACACCGGC GCCGGCTATA
MT..T C.CC.A.... .A.....A..A..G

2301 2350
N TCACCTGCTG GTACCAAACA AGTATAGTGG TTCCACCCGG CACACCCAAA
MT..G... G.....C

2351 2400
N AAGTGTGTCA TCCTGTGCTT TGTGTCAGCG TGTAATGATT TC1CCGTGAG
MGC.C.

2401 2450
N CATGCTGAGT GACACACCAT TCATCGGCCA AACAGCACTG CTGCAGAGCC
MC.A..... ..A..AG.TG

2451 2500
N CTGTGGAAGA AGCTGAAGAG AACGCAGTTG CACGTGTGGC TGACACAATT
M A.AC...C.T G..C.TCA.C ..T....A. .CA.G..A.. ...T.....

2501 2550
N GCCAGTGGGC CCAGCAACTC CGAGAGCGTT CCTGCACTAA CAGCAGTTGA
MACT...A..C.....

2551 2600
N GACTGGGCAC ACATCACAGG TAGTGCCTAG TGACACAATG CAAACAAGGC
MA..... .T.....C...

2601 2650
N ATGTGAAGAA CTACCATTCTG AGATCTGAGT CAACAATAGA GAACTTCCTT
MA..... C.....A.

2651 2700
N AGCAGGTCCG CCTGTGTGTA TATTGAAGAG TACTATACCA AACTGAAAC
M ...C...G.A..T..... .AGA.C..G.

2701 2750
N CAGACAAAAT TTATACATGT TGCCCACTAT AAATACTAGA TGGATGGTGC
M ...CGCC... AGG..... CATGG..... .G..... A.....

2751 2800
N AATTGAGGAG AAAGTTTGAG ATGTTACAT ACATGAGGTT TGACATGGAA
MC.A C.....C.... ..T....G

2801 2850
N ATCACATTTG TTATCACTAG TAGACAACCTG CATCGAACTA GCATGCCGCA
MC.G.G....CG....

2851 2900
N GGACATGCCG GTACTGACAC ACCAAATCAT GTATGTACCA CCTGGTGGTC
M A..... CC.....A....C

2901 2950
N CAGTACCAA CAGTGTGGAC GATTACGCAT GGCAAACCTC GACTAACCCA

ES 2 566 146 T3

MAC.TT....T...

2951 3000
N AGTGTCTTTT GGA CTGAGGG CAATGCCCA CCGCGTATGT CCATACCATT
M ...A.....C

3001 3050
N CATAAGCATA GGAATGCAT ACAGCAACTT TTATGATGGG TCCTCGCACT
M T.....C..R .GG.....

3051 3100
N TCTTACAATA TGGGGTATAT GGCTACAACA CATTAAACAA CATGGGGAAA
M ...C...A.CTGC...

3101 3150
N TTATACGTAC GCCATGTGAA CAACCACACA CCATACCAA TGACCAGTAC
MC..AG..... ..G.....G. ..T.....

3151 3200
N GGTTAGTGTG TACTTTAAAC CCAAACATGT CAGAGCGTGG GTGCCGAGAC
M .A..C.....A.T.... ..A....

3201 3250
N CACCACGTCT GTGCCCTAC AAAAATGCAT GGAACGTTAA CTTTGAACCA
MT.T .TT..AT.TA .T.....C...

3251 3300
N ACAAACGTAA CTGATTCAAG ATCAAGTATC ACATATATTC CTGAGACGGT
M ..C...C...AG.G. .A..C..TA.

3301 3350
N CAAACCAGAC CTATCAAAG CTGGAGCTTT CGGCCACCAG TCCGGTGTG
M .CGT..G..A G.CCGT.C.AAA..

3351 3400
N TTTATGTGGG TAACTACAGA GTGGTGAATA GGCACCTCGC CACGCACAAC
MC..... ..T..... A.A.....C.

3401 3450
N GACTGGCAAA ACTGTGTGTG GGAAGACTAC AACAGAGACC TCCTTGTGAG
M

3451 3500
N CACCACCACA GCCCATGGGT GTGACACCAT AGCCAGATGC CAGTGCACAA
MT...T..TG

3501 3550
N CAGGCGTGTA CTTTTGTGCC TCAAGGAACA AACACTACCC AGTCACCTTT
MA.. T.....T.....C

3551 3600
N GAGGGGCCAG GCCTGGTGA AGTTCAGGAG AGTGAGTACT ACCCAAAAAG
MT..... ..C.....

3601 3650
N ATACCAATCC CATGTGCTTC TAGCTGCAGG ATTTTCTGAA CCAGGCGATT
M .Y.T..G... ..C.....G.....

3651 3700
N GTGGTGAAT CCTCAGGTGT GAACATGGTG TCATCGGTAT CGTCACCATG
MC.....A... C....C..C. .G.....

ES 2 566 146 T3

```

3701                                     3750
N GGTGGAGAGG GGGTCGTTGG GTTGCCGAC GTCCGAGACC TACTGTGGTT
M .....A.....

3751                                     3800
N AGAGGATGAT GCCATGGAAC AGGGCGTAAG AGACTATGTT GAACAAC TAG
M .....

3801                                     3850
N GAAATGCTTT TGGCTCAGGT TTCACCAACC AAATTTGTGA ACAAGTCAAC
M .....C.....T.....G.....

3851                                     3900
N CTCCTCAAAG AGTCACTGGT TGGACAGGAC TCCATTCTGG AGAAATCCCT
M .....T.....T..T.....A.....

3901                                     3950
N TAAAGCCCTA GTTAAGATTA TCTCAGCACT GGTCATTGTA GTGAGAAATC
M ...G..T... ..R.....

3951                                     4000
N ACGATGACCT CATCACAGTG ACTGCCACTC TAGCCCTCAT TGGTTGCACC
M .....T.. ..A..G..T ..C.....TT.A..

4001                                     4050
N TCTTCTCCAT GCGGGTGGCT CAAACAGAAA GTGTCACAAT ATTATGGAAAT
M .....G. ....G.....G .....

4051                                     4100
N ACCCATGGCT GAGCGACAAA ACAATGGCTG GCTCAAGAAG TTCACTGAGA
M .....G...C .....A....T.....

4101                                     4150
N TGACCAATGC CTGCAAGGGC ATGGAGTGGA TAGCCATCAA AATTCAAAAA
M .....C. ....A.....G

4151                                     4200
N TTTATTGAGT GGCTTAAAGT CAAGAT-CTA CCAGAAGTGT AGGAAAAACA
M .....T..G ..G.....A .....

4201                                     4250
N TGAGTTCCTC AACAGACTAT AACAACTACC ACTCTTGGA GAGTCAGATT
M C.....G...A .G...T....C.A..- ..C.....

4251                                     4300
N GCCACCATAG AACAAAGTGC ACCATCGCAG AGTGACCAGG AGCAACTGTT
M ..A......G..G.....T..A.....C..

4301                                     4350
N TTCCAATGTC CAGTACTTCG CCCACTATTG CAGAAAGTAT GCGCCACTGT
M C.....C... ..T.....T.....

4351                                     4400
N ATGCAGCTGA GGCAAAGAGA GTGTTCTCCC TTGAGAAGAA AATGAGCAAT
M .C..T..C.. A..G.....A.....C

4401                                     4450
N TACATACAGT TCAAGTCCAA ATGCCGTATT GAGCCTGTAT GTTGTCTCNT
M .....C..A...C.

```

ES 2 566 146 T3

4451 4500
N ACATGGCAGC CCAGGGGCCG GAAAATCCGT GGCCACCAAC CTGATTGGCA
MG..... T.....

4501 4550
N GATCACTCGC TGAAAACTC AACAGCTCAG TGTACTCCCT ACCACCAGAC
MC..... A.....T. .R.....

4551 4600
N CCAGATCACT TTGATGGCTA CAAACAGCAA GCGGTCGTGA TCATGGATGA
M ..C..C....C..... .G.....

4601 4650
N TCTATGCCAA AATCCTGATG GAAAAGATGT GTCATTGTTC TGTCAAATGG
M CT..... C...C.A..TG....

4651 4700
N TTTCCAGTGT GGACTTTGTA CCACCGATGG CTGCGCTAGA GGAGAAAGGC
MT..C..A.....

4701 4750
N ATTCTGTTC AATCCCCGTT TGTCCCTGGCA TCAACCAATG CTGGGTCCAT
M ..C..A..T.C..GT..... ..C.....

4751 4800
N CAATGCACCA ACTGTGTCAG ACAGCAGAGC CCTCGCTAGG AGATTCCACT
MCT.G.....

4801 4850
N TTGACATGAA CATTGAAGTC ATTTCCATGT ACAGTCAAAA TGGCAAGATC
MT..... C.....

4851 4900
N AACATGCCCA TGTCAGTTAA GACGTGIGAT GAAGAGTGTT GTCCAGTCAA
MA..A..... ..T..

4901 4950
N CTTCAAGAGG TGCTGCCCGC TGGTGTGTGG AAAGGCCATG CAGTTCATTG
MA...TY... ..A.....

4951 5000
N ACAGAAGAAC TCAAGTTAGA TACTCGCTGG ACATGCTAGT TACTGAGATG
M .T..G..... ..T..... ..A...

5001 5050
N TTTAGGGAGT ACAACCACAG ACACAGTGTG GGAGCCACCC TTGAGGCTCT
MT.....T..T.A.....

5051 5100
N GTTCCAAGGG CCACCAGTCT ACAGAGAGAT CAAAATTAGT GTCGCACCAG
MC.....C.....C....

5101 5150
N AGACACCACC ACCACCAGCT ATTGCTGACT TACTGAAATC AGTGACAGT
MC..T.

5151 5200
N GAAGCTGTGA GAGAGTACTG CAAAGAAAAG GGATGGCTTG TGCCAGAGAT
MG..A..... .G..G.GA ..G.....

5201 5250

ES 2 566 146 T3

```

N CAACTCCACC CTACAAATTG AGAAGCATGT GAGCCGGGCA TTCATCTGTC
M ...T..T... ..A. .... . . .TA.A... ..A...T

5251                                     5300
N TGCAAGCACT AACCACGTTT GTTTCAGTTG CTGGAATAAT ATACATATT
M .A.....C.. ..... . . .T.....

5301                                     5350
N TACAAGCTAT TTGCAGGTTT CCAAGGCGCA TACACAGGGA TGCCCAACCA
M .....AT... .....C .....

5351                                     5400
N GAAACCCAAG GTGCCACCC TGAGACAAGC CAAAGTGCAA GGCCACGCGT
M .....T... .....G.. .....A..G .....

5401                                     5450
N TTGAGTTTGC TGTGGCGATG ATGAAGAGGA ACTCCAGTAC AGTGAAAACC
M .....C.. .....A.... ..G..... ..A.....

5451                                     5500
N GAGTACGGTG AGTTCACCAT GCTTGGCATT TATGACAGGT GGGCGGTGTT
M ..... ..A..... ..C....A.. .....

5501                                     5550
N ACCACGCCAC GCCAAACCTG GCCCAACCAT CTTGATGAAT GACCAGGAAG
M ...G..... ..G.... ..C..... ..T.....

5551                                     5600
N TCGGCGTGTT GGATGCCAAG GAACTAGTGG ATAAGGATGG GACAAACCTA
M ..... ..T. ....A..... ..T...

5601                                     5650
N GAACTGACAC TCCTGAAGCT CAACAGTAAT GAGAAGTTCA GAGACATCAG
M ...T....T. ....C....C ..A..... ..T..T..

5651                                     5700
N AGGTTTCCTA GCCAAAGAAG AGGTTGAGGT GAATGAAGCT GTCCTAGCAA
M G.....T... ..A.G..... ..A.....

5701                                     5750
N TAAACACAAG CAAGTFCCTC AACATGTACA TACCAGTGGG CCAGGTGACT
M ....T..... ..A.....T .....

5751                                     5800
N GACTACGGGT TCCTGAACCT GGGTGGGACG CCCACTAAGA GAATGCTCAT
M ..... .T..... ..A....T .....G....

5801                                     5850
N GTACAACCTC CCCACTAGAG CAGGTCAGTG TGGTGGTGTC CTCATGTCCA
M ...T..... ..A..... ..A.....

5851                                     5900
N CTGGGAAAGT CCTGGGGATA CATGTTGGTG GGAATGGTCA TCAAGGGTTC
M .A..... ..A.... ..A..A. ....A.....

5901                                     5950
N TCAGCAGCAC TCCTCAAGCA CTACTTCAAC GATGAACAAG GTGAAATAGA
M .....G.... .....G.... ..G..G..G. ....

5951                                     6000
N GTTCATTGAG AGCTCAAAGG ACGCGGGGTT CCCTATCATC AACACACCCA

```

ES 2 566 146 T3

M A.....A.....G.G... ..T....

6001 6050
N GCAAGACCAA ACTGGAACCA AGTGTCTTCC ACCAG-TGTT TGAAGGCAAC
M .T.....A.. .T..... .G..T.G.... C..G.....

6051 6100
N AAAGAACCCA GCAGTCCTCA GAAATGGTGA TCCACGACTC AAAGCCAAC
M ..G.....- ..G.....T.G.. C.....

6101 6150
N TTGAGGAGGC CATCTTCTCC AAATACATTG GCAATGTCAA CACGCATGTG
M .C.....A.. A..... .G..... ..A.....

6151 6200
N GATGAGTACA TGTGGAAGC TGTGGACCAT TATGCAGGAC AACTGGCTAC
MG..A.....

6201 6250
N TCTGGACATC AGCACGGAAC CAATGAAGCT GGAGGATGCC GTGTATGGTA
MT.....G. .C..... A.....C....

6251 6300
N CAGAGGGGCT GGAAGCACTA GACCTAACAA CCAGTGCAGG CTACCCATTAT
MC.C.....

6301 6350
N GTTGCCCTGG GCATCAAGAA GAGAGACATC CTATCTAAGA AGACCAGGGA
M ..G..... A.....T..TT.AA..

6351 6400
N CCTCACTAAG TTGAAAGAAT GCATGGACAA GTATGGCCTA AACCTGCCAA
MG....A..... .TT.....

6401 6450
N TGATAACCTA TGTGAAAGAT GAGCTCAGAT CTGCAGAGAA GGTGGCCAAA
MC..C..... ..T.G....T..... ..G.....

6451 6500
N GGAAAATCCA GGCTTATTGA AGCTTCCAGT TTGAATGACT CAGTGGCAAT
MG.....T... C.C..... ..A.....

6501 6550
N GAGACAGACA TTTGAAACC TGTACAAAAC CTTCCACCTC AACCCAGGCA
M ...G..A... ..TT .A..T..G.. ..T..... ..G.....

6551 6600
N TTGTGACGGG CAGTGCAGTT GGGTGTGACC CAGATCTGTT TTGGAGCAAG
M .C..T..... ..T... ..T.G....

6601 6650
N ATACCAGTCA TGTGGATGG ACATCTCATA GCTTTTGATT ACTCAGGCTA
M ..C..T..T. ..C.T..... ..C. .T.....

6651 6700
N TGATGCTAGC CTCAGCCCAG TGTGGTTTGC ATGTCTGAAA CTGCTCCTAG
M ...C..... ..T..... ..T.....

6701 6750
N AGAAGCTTGG GTACACACAC AAGGAAACAA ACTACATAGA TTACCTCTGC
MA..A.. ..T...A.. ..T.....

ES 2 566 146 T3

```

6751                                     6800
N AACTCCCACC ACCTGTACAG AGACAAACAC TACTTTGTGC GAGGTGGTAT
M ..T.....T. ....T.. .....G... .....AA ....C.....

6801                                     6850
N GCCATCAGGG TGTTCGGCA CCAGCATCTT TAACTCAATG ATTAACAACA
M .....A.... .....A.. ...T..C... .....

6851                                     6900
N TCATAATCAG GACTTCATG CTGAAAGTGT ACAAGGGCAT TGACTGGAC
M .....T..... .....G..T. .T..A..... ...T.....

6901                                     6950
N CAATTCAGGA TTATTGCTA TGGTGATGAT GTGATTGCTT CCTACCCGTG
M .....A. .G..... ...G..... .....T.....

6951                                     7000
N GCCCATTGAT GCTTCCCTGC TAGCTGAAGC AGGAAAAGAT TATGGTTTGA
M ...T..C... .....G...T .....A.

7001                                     7050
N TCATGACACC AGCAGATAAA GGAGAGTGCT TCAATGAAGT CAACTGGACG
M .....C.. .....C... ..C..... ....C..G.. A.C.....

7051                                     7100
N AATGTCACCT TCCTGAAAAG GTACTTTAGA GCAGATGAGC AATACCCATT
M .....G.... .T..... .....G .....

7101                                     7150
N CCTGGTCCAC CCTGTTATGC CCATGAAAGA CATCCATGAA TCTATTAGAT
M T.....T .....A.....G.. .....G .....G.

7151                                     7200
N GGACCAAAGA TCCAAAGAAC ACCCAAGATC ATGTGCGCTC GCTGTGCCTA
M .....C..... ..A..G.... .....

7201                                     7250
N TTGGCTTGGC ACAATGGGGA GCACGAATAT GAGGAGTTCA TTCGCAAAAT
M .....C..... ...A..... .....T. ....G..

7251                                     7300
N CAGAAAGCGT GCCAGTTGGA CGCTGTTTGA CCCTACCTGC GTTTCAACC
M .....-..... ...C.....G .....C.... .....C.. T.....A

7301                                     7350
N CTGCGCAGGA AGTGGTTGGA CTCCTTTTAA AATAA-AGCA CAATTAGTA
M .....C.... .....T.G.... T.....-....

7351                                     7400
N AATTTGAATT GGCTTAACCC TACCGCACTA ACCGAACTAG ATAACGGTGC
M ...CAT.... .....TG. ....T. ....AA....

7401                                     7437
N GGTAGGGGTA AATTCTCCGC ATTCGGTGCG GTCGAGG
M .....

```

ES 2 566 146 T3

Identidad de secuencia: 90,3 %

Apéndice 5: SEQ ID NO:5

Comparación de las secuencias de aminoácidos del virus no modificado (nativo) y del virus modificado

5

N: virus no modificado (nativo)

M: virus modificado

```

      1                               50
N  MGAQVSTQKT GAHETXLSAN GSSIIHYTNI NYKDAASNS ANRQDFTQDP
M  .....H.....

      51                               100
N  GKFTPEVKDI MIKSMPALNS PTVEECGYSD RVRITLGNSTITQESANV
M  .....SA.....L.....

     101                               150
N  VVGYGWPEY LKDEEATAED QPTQPDVATC RFTLESVQW EKNSAGWWWK
M  .....R.....

     151                               200
N  FPEALKDMGL FGQNMHYHYL GRAGYTIHVQ CNASKFHQGC LLVVCVPEAE
M  .....L.....

     201                               250
N  MGCSKVDGTV NEQELTEGET DMKLEPTRTT GVRVQSAVY NAGMGVGVGN
M  ....QT.KE. AAMN..K... AH.F...K.. .GHT...I.C .....I....

     251                               300
N  LTIFPHQWIN LRTNNCATIV MPYINSVPMNMFRRHYNFTL MMIPFAPLDY
M  ...Y.....V.....

     301                               350
N  TNQASTYVPI TVTIAPMCAE YNGLRLVTSQ GLPVMNTPGS NQFLTSDDFQ
M  NA...E...V .....AYQ. ....L.....M.....

     351                               400
N  SPSAMPQFDV TPDMDIPGEV NNLMEIAEVD SVVPVNNNEA NLKSMDAYRI
M  .....H.....H.....TA. ..Q.....H.

     401                               450
N  PVNXGNQQGE KIFGFQIQPG LDSVFKRLL GEMLNYYTHW SGSIKLTFMF
M  E.....H... ..A..... ..V....A.. .....T.

     451                               500
N  CGSAMATGKL LLAYSPPGAD VPTSREKAML GTHVIWDFGL QSSCVLCVPW
M  .....A...Q..M ...I...L.. .....I..

     501                               550
N  ISQTHYRLVQ QDEYTGAGYI TCWYQTSIVV PPGTPKKCVI LCFVSACNDF
M  .....S..NV .....G... ..N...V .....

     551                               600
N  SVSMLSDTPF IGQTALLQSP VEEAEENAVA RVADTIASGP SNSVSPALT
M  ..R..R.... ..T...GD TDV.VN.... .....T.I....

    601                               650

```

ES 2 566 146 T3

N AVETGHTSQV VPSDTMQTRH VKNYHSRSES TIENFLSRSA CVYIEEYYTN
M E.....

651 700
N TETRONLYML PTINTRWVQ LRRKFEMFTY MRFDMETTV ITRQLHRTS
M DQDSA.R.S W...ARR...

701 750
N MPQDMPVLTH QIMYVPPGGP VPNSVDDYAW QTSTNPSVFW TEGNAPPRMS
M IA....P... ..I.....

751 800
N IFFISIGNAY SNFYDGSSH F LQYGVYGYNT LNMGMKLYVR HVNHTPYQM
MW... S.N.....AA...KD.....

801 850
N TSTVSVYFKP KHVRAWVPRP PRLCPYKNAW NVNFEPNTVT DSRSSITYIP
M S..IR..... ..I.V.....

851 900
N ETVKPDLSKA GAFGHQSGAV YVGNRYVVNR HLATHNDWQN CVWEDYNRDL
M D.IR.EVRT. .K.....

901 950
N LVSTTTAHGC DTIARCQCTT GYVFCASRNK HYPVTFEGPG LVEVQSEYY
MA.....

951 1000
N PKRYQSHVLL AAGFSEPGDC GGILRCEHGV IGIVTMGGEG VVGFDVDRDL
M ...X.....

1001 1050
N LWLEDDAMEQ GVRDYVEQLG NAFGSGFTNQ ICEQVNLKE SLVGQDSILE
M

1051 1100
N KSLKALVKII SALVIVVRNH DDLITVTATL ALIGCTSSPW RWLQKQVSQY
MX.....

1101 1150
N YGIPMAERQN NGWLKFTTEM TNACKMEWI AIKIQKFI EW LKVKIYQKCR
MR..... .S.....

1151 1200
N KNMSSSTDYN NYHSWKSQIA TIEQSAPSQS DQEQLFSNVQ YFAHYCRKYA
M EKHEFLNRLK QLPLLE....

1201 1250
N PLYAAEAKRV FSLEKKMSNY IQFKSKCRIE PVCLLXHGSP GAGKSVATNL
M

1251 1300
N IGRSLAEKLN SSVYSLPPDP DHFDGYKQQA VVIMDDLCQN PDGKDVSLFC
M

1301 1350
N QMVSSVDFVP PMAALEEKGI LFTSPFVLAS TNAGSINAPT VSDSRALARR
M

1351 1400
N FHFDMNIEVI SMYSONGKIN MPMSVKTCD ECPVNFKRC CPLVCGKAMQ

ES 2 566 146 T3

```

M .....

      1401                                1450
N FIDRRQTQVRY SLDMLVTEMF REYNHRHSVG ATLEALFQGP PVYREIKISV
M .....

      1451                                1500
N APETPPPPAI ADLLKSVDSE AVREYCKEKG WLVPEINSTL QIEKHVSRAF
M .....R.....

      1501                                1550
N ICLQALTTFV SVAGIIYIY KLFAGFOGAY TGMPNQKPKV PTLRQAKVQG
M .....

      1551                                1600
N PAFEFVAVAMM KRNSSTVKTE YGEFTMLGIY DRWAVLPRHA KPGPTILMND
M .....A.....K.....

      1601                                1650
N QEVGVLDAKE LVDKDGTNLE LTLCLKNSNE KFRDIRGFLA KEEVEVNEAV
M .....R.....R.....

      1651                                1700
N LAINTSKFPN MYIPVQVTD YGFLNLGGTP TKRMLMYNFP TRAGQCGGVL
M .....

      1701                                1750
N MSTGKVLGIH VGGNGHQGFS AALLKHYFND EQGEIEFIES SKDAGFPIIN
M .....R...E.....V..

      1751                                1800
N TPSKTKLEPS VFHQCLKATK NPAVLRNGDP RLKANFEEAI FSKYIGNVNT
M .....VFEGN. E.....

      1801                                1850
N HVDEYMLEAV DHYAGQLATL DISTEPMKLE DAVYGTEGLE ALDLTTSAGY
M .....

      1851                                1900
N FYVALGIKKR DILSKKTRDL TKLKECMDKY GLNLPMTYVY KDELRSAEKV
M .....K.....

      1901                                1950
N AKGKSRLIEA SSLNDSVAMR QTFGNLYKTF HLNPGIVTGS AVGCDDPLFW
M .....V..

      1951                                2000
N SKIPVMLDGH LIAFDYSGYD ASLSPVWFAC LKLLLEKLG Y THKETNYIDY
M .....N.....

      2001                                2050
N LCNSHHL YRD KHYFVRGGMP SGCSGTSIFN SMINNIIRT LMLKVYKGID
M .....

      2051                                2100
N LDQFRIIAYG DDVIASYPWP IDASLLAEAG KDYGLIMTPA DRGECFNEVN
M .....M.....T

      2101                                2150
N WTNVTFLKRY FRADEQYPFL VHPVMPMKDI HESIRWTKDP KNIQDHVRSL
M .....

      2151                                2196
N CLLAWHNGEH EYEEFIRKIR KRASWTLFDP TCVFNPAQEV VGLLLK
M .....Q.....SVPVGRCLTL PAFSTLRRKW LDSF--

```

5

Identidad de secuencia: 91 %

REIVINDICACIONES

- 5 1. Enterovirus modificado de tipo ECHO 7, caracterizado por una secuencia del genoma que tiene al menos 85 %, preferiblemente al menos 95 %, aún más preferiblemente al menos 99 % de la secuencia idéntica a la SEQ ID NO:1 y
- 10 en el que los cambios en la secuencia del genoma del enterovirus modificado no son superiores al 0,7 % después de la propagación continua del enterovirus modificado en cultivos celulares durante 12 meses.
- 15 2. Enterovirus modificado de tipo ECHO 7, caracterizado por la secuencia del genoma de la SEQ ID NO: 1.
3. Método de fabricación de un enterovirus modificado de tipo ECHO 7 mediante modificación del virus ECHO 7 nativo, identificado por la secuencia del genoma SEQ ID NO: 2, en el que la modificación comprende realizar la adaptación del virus en las células cancerosas, atenuado por un agente antineoplásico, posteriormente hacer pases del virus modificado en un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos, propagar el virus modificado en células de melanoma humano y posteriormente hacer pases del virus modificado en un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos, opcionalmente tratado con ribavirina, aislar el virus y purificar el virus.
- 20 4. Método de la reivindicación 3, en el que el procedimiento de propagar el virus en las células cancerosas y posteriormente hacer pases del virus modificado en un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos se repite varias veces.
- 25 5. Método de la reivindicación 3 o 4, en el que el procedimiento de propagar el virus modificado en las células de melanoma humano y posteriormente hacer pases del virus modificado en un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos se repite varias veces.
- 30 6. Método de la reivindicación 3, 4 o 5, en el que la adaptación del virus se lleva a cabo en células cancerosas de por lo menos dos tipos diferentes de cáncer, tales como células de adenocarcinoma de mama humano y células de adenocarcinoma gástrico.
- 35 7. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que la modificación da un enterovirus modificado de tipo ECHO 7, que se caracteriza por una secuencia del genoma que tiene al menos 85 %, preferiblemente al menos 95 %, aún más preferiblemente al menos 99 % de la secuencia idéntica a la SEQ ID NO:1 y en el que los cambios en la secuencia del genoma del enterovirus modificado no son superiores al 0,7 % después de la propagación continua del enterovirus modificado en cultivos celulares durante 12 meses.
- 40 8. Método de la reivindicación 7, en el que la modificación da un enterovirus modificado del tipo ECHO 7, que se caracteriza por una secuencia del genoma de la SEQ ID NO: 1.
9. Método de la reivindicación 7 u 8, en el que los cambios son sustituciones de un nucleótido, que consisten parcialmente en mutaciones silenciosas sin el cambio de aminoácidos correspondiente.
- 45 10. El virus de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades oncológicas.
11. El virus para su uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad oncológica se selecciona del grupo que consiste en: melanoma, cáncer gástrico, cáncer intestinal, cáncer de mama humano, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, linfosarcoma, cáncer de útero, angiosarcoma y rabdomiosarcoma.
12. El virus para su uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad oncológica es el melanoma.