

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 842 211**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014 PCT/IB2014/063411**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011676**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014 E 14776902 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 3024937**

54 Título: **Pseudovirión del virus del papiloma humano producido por plantas**

30 Prioridad:

25.07.2013 ZA 201305650

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

13.07.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CAPE TOWN (100.0%)
Lovers Walk Rondebosch
Cape Town 7701, ZA**

72 Inventor/es:

**RYBICKI, EDWARD, P. y
HITZEROTH, INGA ISABEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 842 211 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

Pseudovirión del virus del papiloma humano producido por plantas

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir pseudoviriones del virus del papiloma humano (VPH) en células vegetales, la planta produjo pseudoviriones por sí misma, un ensayo de neutralización que usa los pseudoviriones producidos por la planta y composiciones farmacéuticas que comprenden los pseudoviriones producidos por la planta.

Los solicitantes han utilizado nuevos vectores de replicación autónoma junto con vectores no replicantes previamente desarrollados para producir pseudoviriones (PsV) del VPH-16 *in planta*. Los ensayos de expresión preliminares establecieron condiciones y plazos óptimos para la producción de cada elemento individual necesario para el ensamblaje de los PsV del VPH. Los elementos estructurales necesarios para la producción de PsV son las proteínas L1 y L2 del VPH, producidas por los vectores de expresión de plantas no replicantes pTRAc-hL1 y pTRAc-hL2, respectivamente; y ADN circular de cadena doble a partir de uno de los tres replicones derivados de pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ o pRIC3-mluc+. Las supuestas partículas de PsV, así como las partículas similares a virus (VLP) de L1/L2 producidas en ausencia de los replicones, se recolectaron de las plantas y se purificaron mediante sucesivas etapas de ultracentrifugación en gradiente. Las fracciones de gradiente que contenían L1 se reunieron y dializaron contra PBS NaCl con alto contenido de sal (0,5 M), para obtener PsV purificados. Se confirmó mediante microscopía electrónica que eran conformacionalmente similares a las VLP y los PsV producidos en otros sistemas, y mediante PCR que contenían el correspondiente replicón de ADN encapsulado. Se utilizaron PsV purificados para demostrar su uso en un ensayo de neutralización. Dos de los tres PsV creados, a saber, mSEAP y PsV mluc+, demostraron una pseudoinfección y neutralización exitosa con un anticuerpo neutralizante común del VPH-16, mientras que los PsV mSEAP+ no mostraron expresión del gen informador después de la pseudoinfección de células de mamífero. Este es el primer informe conocido de la producción y purificación de PsV del VPH, así como VLP de L1/L2 *in planta*, así como la primera demostración de un ensayo de neutralización basado en pseudovirión (PBNA) utilizando PsV producidos por plantas.

Los cánceres de cuello uterino provocados por el VPH de alto riesgo son la segunda forma de cáncer más prevalente en las mujeres de los países en desarrollo. África en particular ha sido identificado como una región de alto riesgo para la enfermedad. Las vacunas de VLP de L1 desarrolladas recientemente, Cervarix® y Gardasil^{MR}, protegen contra la infección por VPH-16 y VPH-18, o VPH-6, VPH-11, VPH-16 y VPH-18, respectivamente. Ambas vacunas disponibles actualmente, Cervarix® y Gardasil^{MR}, provocan una respuesta de anticuerpos neutralizantes fuerte y prolongada, y se ha demostrado que tienen una eficacia sostenida hasta 5 años después de la administración. Si bien estas vacunas han demostrado ser muy prometedoras para reducir la carga de la enfermedad, el desarrollo y la producción de vacunas de VLP siguen siendo prohibitivamente costosos, particularmente en los países en desarrollo.

Un elemento clave de cualquier iniciativa de desarrollo de una vacuna contra el VPH es el ensayo de neutralización basado en pseudovirión (PBNA). La inducción de anticuerpos neutralizantes es actualmente la mejor estimación de la eficacia del candidato a vacuna para las pruebas de la vacuna contra el VPH de segunda generación. Hasta hace poco, la identificación de anticuerpos neutralizantes en suero se basaba en el uso de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o ensayos de neutralización con virus completo (Dessy et al., 2008). Sin embargo, las mejoras en la eficiencia de producción de PsV del VPH en la última década han permitido el desarrollo del PBNA. Desarrollado por el grupo de John Schiller en el Centro de Investigación del Cáncer, este ensayo utiliza células de mamíferos para la producción intracelular de PsV que expresan un gen informador de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) (Buck et al., 2005a), y desde entonces se ha convertido en el estándar dorado para las pruebas de neutralización de las posibles vacunas contra el VPH, lo que permite una detección rápida y sin sesgos de anticuerpos y epítomos neutralizantes (Stanley et al., 2008). Si bien se ha demostrado que este método de producción es extremadamente eficaz para la producción de PsV, la producción de cultivos celulares es costosa y los kits de ensayo de SEAP son particularmente costosos en comparación con otros ensayos informadores de uso común, tales como luciferasa o GFP. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos de producción de PsV alternativos para permitir el desarrollo de una vacuna candidata asequible y, en particular, pruebas económicas de sueros inmunes.

Durante mucho tiempo se ha entendido que la producción de anticuerpos de IgG neutralizantes en respuesta a la vacunación es un aspecto clave de la inmunidad protectora (Robbins et al., 1995). Se ha sugerido que puede ser posible estimar con precisión el nivel requerido de anticuerpo neutralizante requerido para la protección, siempre que la concentración, el isotipo y la actividad biológica secundaria de estos anticuerpos puedan medirse con precisión (Robbins et al., 1995). Los ensayos de neutralización se desarrollaron como un método para cuantificar con precisión las capacidades neutralizantes de los sueros inmunes, generalmente en respuesta a una exposición a un virus vivo o candidato a vacuna, así como para identificar epítomos neutralizantes (Ochsenbauer y Kappes, 2009; Yeager et al., 2000).

La primera demostración de neutralización *in vitro* del virus del papiloma fue hecha por Dvoretzky et al. (1980), quienes demostraron la neutralización con antisueros del virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB-1) producidos en conejos para

confirmar el papel del VPB-1 en la formación de focos en líneas celulares de ratón. Los primeros esfuerzos para establecer un ensayo de neutralización *in vitro* robusto y sensible para los VPH se vieron obstaculizados por las dificultades en la producción de virus infeccioso. La producción de viriones infecciosos *in vitro* se logró por primera vez injertando material infectado con VPH-11 en ratones atímicos; los injertos se dejaron para que se convirtieran en quistes condilomatosos durante un período de 3-5 meses, antes de ser recolectados y purificados para viriones del VPH (Kreider et al., 1987). Este método se utilizó para producir viriones para su uso en el primer ensayo de neutralización de hecho. Se identificaron y aislaron anticuerpos monoclonales neutralizantes de los antisueros del VPH-11 o VPB-1. Estos anticuerpos se usaron luego para demostrar la neutralización de viriones intactos por ELISA, así como para identificar varios epítomos conformacionales neutralizantes (Christensen et al., 1990). El mismo grupo usó este método para identificar con éxito los anticuerpos neutralizantes del VPH en sueros humanos por primera vez, y además demostró que ELISA era un buen informador de la presencia de anticuerpos neutralizantes en sueros humanos (Christensen et al., 1992). Otro enfoque acopló la neutralización de la infección por VPH-11 con la detección por RT-PCR de las transcripciones de ARNm del VPH para crear un ensayo de neutralización semicuantitativo (Smith et al., 1995). Si bien estos enfoques fueron nominalmente exitosos en la identificación de anticuerpos neutralizantes, la detección permaneció limitada en el mejor de los casos y los procedimientos utilizados consumieron mucho tiempo y fueron costosos.

Un gran paso adelante en la tecnología del ensayo de neutralización llegó con el advenimiento de la producción de PsV, que anuló la necesidad del costoso y lento método de producción de xenoinjertos. Roden et al. (1996) utilizaron células BPHE-1 de hámster para generar PsV de VPB-1 o VPH-16. Estos se utilizaron para demostrar la formación de focos en células C127, utilizando la técnica demostrada por Dvoretzky et al. (1980). Estos investigadores demostraron además que los anticuerpos neutralizantes en los antisueros del VPH-16 impedían la formación de focos, demostrando un ensayo de neutralización cuantitativo de un tipo del VPH de alto riesgo utilizando PsV por primera vez (Roden et al., 1996). En este informe, los autores señalaron que el ensayo de transformación de foco requirió de 2 a 3 semanas y que la inclusión de un gen marcador o informador mejoraría en gran medida la velocidad del ensayo. Esto se intentó en primer lugar uniéndolos químicamente un plásmido informador de β -lactamasa (BLAM) a VLP o viriones infecciosos, e incubándolos con antisueros de VP antes de infectar varias líneas celulares de mamíferos. Los primeros intentos demostraron neutralización, pero resultaron en <1% de infección de las células con estos PsV (Muller et al., 1995). Yeager et al., (2000) y Bousarghin et al., (2002) demostraron este enfoque con más éxito, utilizando un plásmido informador BLAM o luc y un método alternativo para unir el plásmido a las VLP. Más importante aún, varios grupos generaron PsV con genes informadores encapsulados y demostraron su uso para ensayos de neutralización (Buck et al., 2005a; Fleury et al., 2008; Kawana et al., 1998; Rossi et al., 2000; Stauffer et al., 1998; Touze y Coursaget, 1998; Unckell et al., 1997). Si bien los primeros intentos fueron ineficaces debido a los bajos niveles de producción de PsV, esto se mejoró mediante la generación intracelular de altos rendimientos de PsV de L1/L2 y la incorporación de un plásmido informador SEAP (Buck et al., 2004). Estos PsV se utilizaron con un kit de detección SEAP disponible comercialmente para demostrar un ensayo de neutralización basado en pseudoviriones que fue al menos tan sensible como, y potencialmente de tipo más específico, que el ensayo de neutralización estándar basado en ELISA (Pastrana et al., 2004).

Aunque el sistema desarrollado por Pastrana et al., (2004) se considera el ensayo de neutralización de "mejores prácticas" actual, queda margen de mejora. En particular, los costes de producción de PsV podrían disminuir considerablemente mediante el uso de un sistema de producción menos costoso (Brondyk, 2009). Se ha demostrado que la expresión de proteínas recombinantes en plantas tiene un coste de producción significativamente menor en comparación con la producción en células de mamíferos (Tiwari et al., 2009). Como tal, la expresión en plantas puede proporcionar una alternativa atractiva para la producción de PsV para su uso en el PBNA.

La expresión de proteínas recombinantes en plantas se ha desarrollado durante los últimos veinte años a partir de una curiosidad a finales de la década de 1980 hasta un sistema de producción de relevancia médica e industrial en la actualidad. Los primeros esfuerzos se basaron en la transformación de plantas para producir líneas transgénicas estables. Esto se logró mediante la administración biológica o, más recientemente, la agroinfiltración (Daniell et al., 2009). Si bien la producción de proteínas transgénicas sigue siendo un sistema útil y viable, los avances en los métodos y la tecnología de expresión transitoria han posicionado la expresión transitoria como el método preferido para la producción a escala industrial en plantas (Rybicki, 2010). Dos factores clave que han jugado un papel central en esta transición son los vectores de expresión virales, o derivados de virus, y el desarrollo de la tecnología de agroinfiltración.

La agroinfiltración se desarrolló originalmente como una alternativa al bombardeo biológico para la transformación estable de plantas (Kapila et al., 1997). Este proceso se basa en la capacidad de transferencia de ADN de *A. tumefaciens* para introducir ADN foráneo en las células vegetales. *A. tumefaciens* se puede usar para transferir un transgén ubicado en el segmento de transferencia de ADN (ADN-T) del plásmido Ti a plantas infiltradas con una suspensión bacteriana de la bacteria transformada. El ADN-T se transporta al núcleo de la planta y esto permite la transformación de la planta mediante la integración del ADN-T en el genoma de la planta (Zupan et al., 2000). Sin embargo, es importante destacar que un transgén incorporado en el ADN-T también puede expresarse de forma transitoria, a partir de ADN-T no integrado o episomal, lo que da como resultado la expresión sistémica de una proteína recombinante sin la necesidad de una transformación estable (Kapila et al., 1997).

Los vectores virales fueron el primer método de expresión transitoria desarrollado para plantas. Los primeros esfuerzos simplemente insertaron un gen o epítipo recombinante en el genoma de virus tal como VMT, virus del mosaico del caupí (VMCP) o PVX, ya sea fusionado a la proteína de la cubierta viral o por separado, bajo el control de un promotor viral subgenómico duplicado (Durrani et al., 1998; Gleba et al., 2007; Turpen et al., 1995). Si bien esta aplicación produjo proteína inmunogénica, los niveles de expresión fueron más bajos que los encontrados en plantas transgénicas. Otros problemas con estos vectores virales de 'primera generación' incluyeron una tendencia a volver al virus natural, restricciones en el tamaño del inserto, dificultad de administración e incapacidad para formar VLP (Kohl et al., 2006; Rybicki, 2010; Varsani et al., 2006).

Estas limitaciones impulsaron un trabajo adicional para desarrollar vectores virales de "segunda generación" o deconstruidos. Este enfoque utilizó solo los elementos virales deseables, en particular la maquinaria replicativa, para fabricar vectores sintéticos capaces de inducir la expresión transgénica en plantas. Si bien estos vectores generalmente no son infecciosos por sí solos, cuando se combinan con la tecnología de agroinfiltración pueden dar como resultado una expresión transitoria sistémica de proteínas a niveles comparables a los de las plantas transgénicas (Tiwari et al., 2009). Este enfoque tiene las ventajas de marcos de tiempo cortos (3-7 días) en comparación con la transformación estable (6-9 meses), niveles de expresión significativos y un escalado y purificación rápidos y fáciles. Esto hace que la expresión transitoria mediada por agroinfiltración a través de vectores virales sea un enfoque ideal para la producción de proteínas y partículas médicamente relevantes en plantas. De particular interés es el uso de expresión transitoria para la producción de VLP y PsV en plantas, ya que existe la posibilidad de una reducción en el coste en comparación con los sistemas tradicionales (Santi et al., 2006).

Varios grupos en plantas han producido VLP de L1 de virus de papiloma. La mayoría ha utilizado plantas transgénicas (Biemelt et al., 2003; Warzecha et al., 2003) con bajos rendimientos resultantes. Los primeros intentos de expresión transitoria de L1 también produjeron bajos niveles de expresión, así como una aparente incapacidad para formar VLP (Varsani et al., 2006). Sin embargo, la agroinfiltración de un vector de *Agrobacterium* que codifica una proteína L1 optimizada para codones humanos proporcionó un rendimiento de proteína mucho mayor y demostró que la expresión transitoria de VLP del VPH-16 a niveles altos es un enfoque factible para la producción de vacunas candidatas inmunogénicas contra el VPH (Maclean et al., 2007).

El vector utilizado para producir L1 a niveles de expresión tan altos, pTRAc, se desarrolló en el Instituto Fraunhofer de Biología Molecular y Biología Aplicada. Este vector utilizó un promotor 35S del CaMV con potenciador transcripcional duplicado, región no traducida 5' de la chalcona sintasa y señal de poliadenilación de 35S del CaMV para la expresión de genes foráneos. Este vector también se ha utilizado para expresar la proteína de la cápside menor L2 en plantas (Pereira, 2008). Sin embargo, no se ha demostrado previamente de manera concluyente que la coexpresión de L1 y L2 forme VLP *in planta*.

Un desarrollo adicional en la tecnología de vectores ha sido el uso de geminivirus vegetales de ADN monocatenario del género *Mastrevirus*, familia *Geminiviridae*, para crear vectores de replicación. Estos vectores de replicación incorporan una secuencia de Ori (origen de replicación) viral que se duplica a cada lado de un casete de expresión génica. Los vectores de replicación además pueden incluir o no un gen de la proteína asociada a la replicación viral (*Rep*). La agroinfiltración de un único constructo de replicón que contiene *Rep*, o de un constructo de replicón más un constructo de *Rep* expresada en trans mediante técnicas estándar, da como resultado la liberación de un "replicón" similar a un plásmido que se multiplica bajo el control de la proteína *Rep* hasta un número de copias de varios miles por célula (Regnard et al., 2010). Esto puede resultar en un aumento significativo de la expresión de genes de interés en comparación con la expresión del vector no replicante. Aunque la expresión de un gen *Rep* de geminivirus y un constructo de replicón afín (por ejemplo: secuencia Ori del mismo virus) en una célula vegetal conduce a la replicación del replicón, no se sabe que esto ocurra en células de mamífero.

Se ha demostrado la encapsulación o unión covalente de ADN por VLP del VPH para formar PsV en sistemas de células de levadura, insectos, bacterias y mamíferos (Buck et al., 2005a; Roden et al., 1996; Rossi et al., 2000; Unckell et al., 1997). Buck et al., (2005a) demostraron que la encapsulación intracelular del pseudogenoma es más eficiente que los métodos de desmontaje y reensamblaje *in vitro* para la producción de PsV del VPH, probablemente debido a factores celulares que ayudan en el ensamblaje correcto de los viriones (Buck et al., 2008; Fleury et al., 2008; Peng et al., 2011). Actualmente, los pseudoviriones del VPH no se han expresado con éxito en sistemas de expresión de plantas. Como se discutió anteriormente, la expresión transitoria en plantas ofrece varias ventajas significativas para esta aplicación: se ha demostrado que la expresión de proteínas en plantas es segura, más barata que otros sistemas de expresión y potencialmente extremadamente rápida (Ma et al., 2005; Schillberg et al., 2005). Otra ventaja significativa es que no hay necesidad de procesamiento posterior de proteínas (por ejemplo, glicosilación), como ocurre con los sistemas de expresión de proteínas recombinantes bacterianas (Giorgi et al., 2010). Si bien se ha observado que la N-glicosilación puede diferir en las plantas (específicamente, las plantas no pueden sintetizar la β -1,4-galactosa y el ácido siálico), este problema puede superarse con los avances recientes en el tabaco transgénico para proporcionar una maquinaria de glicosilación 'humanizada' (Bakker et al., 2006; Gleba et al., 2007). Además, se ha sugerido que L1 o L2 glicosilados no son una parte importante del virión ensamblado (Zhou et al., 1993).

En esta solicitud, los inventores evaluaron la viabilidad de expresar pseudoviriones de L1/L2 del VPH con un casete informador de mamífero encapsulado, derivado de un vector derivado de geminivirus replicante, *in planta*. Para lograr

esto, los plásmidos de pTRAc que expresan las proteínas L1 y L2 se infiltraron conjuntamente en plantas con plásmidos de replicación autónoma novedosos, desarrollados en este estudio, para crear PsV de L1/L2 del VPH. Además, se purificaron estas partículas mediante centrifugación basada en densidad, para pruebas posteriores en un sistema de mamíferos.

Esta invención describe, por primera vez, la producción satisfactoria de PsV del VPH en plantas y la prueba de PsV en un PBNA estándar. Las VLP de L1/L2 del VPH, así como los PsV que contienen un pseudogenoma de casete informador de mamífero derivado del virus de la enana amarilla del frijol de geminivirus (BeYDV), se produjeron en grandes cantidades *in planta*. Las partículas encapsularon fácilmente el ADN del pseudogenoma proporcionado por los vectores de replicación. Además, se purificaban fácilmente, eran estables a alta temperatura y eran conformacionalmente indistinguibles de los PsV producidos en otros sistemas. Lo más importante es que se utilizaron con éxito para realizar un PBNA en células de mamíferos. La producción transitoria de PsV del BPH basada en plantas es una estrategia factible y debe investigarse más a fondo como una alternativa de bajo coste al cultivo de células de mamíferos para la producción de PsV.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona pseudoviriones producidos en células vegetales, métodos para producir pseudoviriones en plantas, un ensayo de neutralización que usa los pseudoviriones producidos por plantas y composiciones farmacéuticas que comprenden los pseudoviriones producidos por plantas.

La presente invención enseña que la coexpresión transitoria de L1 del VPH y L2 del VPH en una célula vegetal junto con la replicación concurrente, a un alto número de copias, de un replicón derivado del virus ADNcs que contiene un gen que codifica un polipéptido heterólogo de interés, da como resultado el ensamblaje de L1 del VPH y L2 del VPH en partículas similares a virus que encapsulan el replicón para formar pseudoviriones. Además, los pseudoviriones y el método para producirlos descritos en esta invención proporcionan un avance significativo para la producción potencial de vacunas y vehículos de administración de ADN para su uso en terapia génica.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un pseudovirión del virus del papiloma humano (VPH) en una célula vegetal, comprendiendo el método las etapas de:

(i) introducir en la célula vegetal:

(a) un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido L1 del VPH; y
 (b) un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido L2 del VPH,
 en el que el primer y segundo ácidos nucleicos están contenidos en al menos un vector de expresión,
 (c) un vector de replicación derivado de un geminivirus que comprende una secuencia de origen de replicación (Ori) reconocida por una proteína asociada a replicación viral (Rep), el vector de replicación comprende además un tercer ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo, en el que el vector de replicación es capaz de experimentar la replicación del círculo rodante, y
 (d) un cuarto ácido nucleico que codifica una proteína Rep,
 en el que la replicación del vector replicante es iniciada por la proteína Rep, y
 en el que el tercer ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia reguladora que permite la expresión del polipéptido heterólogo en una célula de mamífero;

(ii) expresar el polipéptido L1 del VPH y el polipéptido L2 del VPH y la proteína Rep en la célula vegetal, y
 (iii) replicar el vector de replicación de la secuencia de Ori reconocida por la proteína Rep en la célula vegetal, para producir un alto número de copias de un pseudogenoma, en el que el pseudogenoma es más pequeño que el vector de replicación, es replicacionalmente inerte en células de mamífero en la ausencia de la proteína Rep, y comprende el tercer ácido nucleico,

en el que los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH expresados se ensamblan, junto con una copia del pseudogenoma y encapsulan el pseudogenoma para producir un pseudovirión del VPH.

Se apreciará que el primer y segundo ácidos nucleicos están operativamente unidos a secuencias reguladoras que permiten la expresión de los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH.

Se apreciará que la proteína Rep, codificada por un cuarto ácido nucleico, está unida operativamente a secuencias reguladoras, lo que permite la expresión de la proteína Rep. Se apreciará además que el cuarto ácido nucleico puede expresarse a partir de (i) una secuencia de ácido nucleico contenida en el vector de replicación, (ii) una secuencia de ácido nucleico contenida en al menos un vector de expresión, (iii) una secuencia de ácido nucleico contenida en un vector independiente, que no es el vector de (i) o (ii) anteriores; o (iv) una secuencia de ácido nucleico integrada en el ADN genómico de la célula vegetal.

En una realización preferida de la invención, el tercer ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, que incluye un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen informador, un gen terapéutico o un gen que codifica un

polipéptido antigénico, tal como un gen que codifica constructos derivados de la oncoproteína E6 o E7 del VPH para el tratamiento de lesiones cervicales o carcinomas provocados por los VPH. Preferiblemente, el gen que codifica el polipéptido heterólogo es un gen informador seleccionado de un gen de luciferasa o un gen de fosfatasa alcalina secretada.

En una realización adicional de la invención, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH son del VPH 16. Sin embargo, una persona experta en la técnica apreciará que la presente invención funcionará con la misma eficacia para un tipo de VPH para el que se pueden producir partículas similares a virus, que incluyen pero no se limitan a VPH 6, VPH 11, VPH 18, VPH 31, VPH 33, VPH 45, VPH 48, VPH 52 y/o VPH 58, o combinaciones de los mismos.

En otra realización más de la invención, el método incluye una etapa de recuperación del pseudovirión del VPH de la célula vegetal.

De acuerdo a un segundo aspecto de la invención, se proporciona un ensayo para detectar la presencia de un anticuerpo neutralizante del VPH en un sujeto, incluyendo el ensayo las etapas de:

- (i) combinar un pseudovirión del VPH producido de acuerdo con el método de la invención, con una muestra biológica del sujeto para formar una composición de la muestra biológica, en la que el polipéptido heterólogo es un polipéptido informador; y
- (ii) combinar un pseudovirión del VPH producido de acuerdo con el método de la invención, con una muestra biológica de control, en la que la muestra biológica de control no contiene un anticuerpo neutralizante del VPH, para formar una composición de muestra de control, en la que el polipéptido heterólogo es un polipéptido informador;
- (iii) poner en contacto e incubar una célula de mamífero capaz de infectarse con VPH con la composición de la muestra biológica de (i) o la composición de muestra de control de (ii); y
- (iv) ensayar la expresión del polipéptido informador;

en el que la disminución de la expresión del polipéptido informador en las células de mamífero en contacto con la composición de la muestra biológica, en comparación con las células de mamífero en contacto con la composición de la muestra de control, es indicativa de la presencia de un anticuerpo neutralizante del VPH en la muestra biológica.

Preferiblemente, el polipéptido informador usado en el ensayo se selecciona de un polipéptido luciferasa (luc) o fosfatasa alcalina secretada (SEAP).

Más preferiblemente, el ensayo se realiza en una muestra biológica de un sujeto humano.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un pseudovirión del VPH producido de acuerdo con el método de la invención, comprendiendo el pseudovirión del VPH una cápside, en la que la cápside comprende los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH, en la que la cápside encapsula el pseudogenoma que comprende el tercer ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, en el que el tercer ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia reguladora que permite la expresión del polipéptido heterólogo en una célula de mamífero, en el que la replicación del vector replicante se inicia a partir de la secuencia de Ori reconocida por la proteína Rep, y en el que el pseudovirión del VPH se produce y se recupera de la célula vegetal.

En una realización preferida de la invención, se inicia la replicación del pseudogenoma, en una célula de mamífero infectada por el pseudovirión del VPH, en presencia de una proteína Rep. Preferiblemente, la proteína Rep está codificada por una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a una secuencia reguladora que permite la expresión de la proteína Rep en la célula de mamífero. Los expertos en la técnica apreciarán que la proteína Rep puede expresarse a partir de una secuencia de ácido nucleico contenida en el pseudogenoma, una secuencia de ácido nucleico contenida en un vector independiente; o de una secuencia de ácido nucleico integrada en el ADN genómico de la célula de mamífero. Se apreciará además que la expresión de la proteína Rep en la célula de mamífero en presencia del pseudogenoma dará como resultado la replicación del pseudogenoma.

Preferiblemente, el polipéptido heterólogo de esta realización de la invención se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido informador, un polipéptido terapéutico o un polipéptido antigénico, tal como un gen que codifica constructos derivados de la oncoproteína E6 o E7 del VPH para el tratamiento de lesiones cervicales o carcinomas causados por VPH.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un pseudovirión del virus del papiloma humano producido mediante el método de la invención o que contiene el pseudovirión del virus del papiloma humano de la invención y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Se apreciará que la composición farmacéutica puede ser una composición de vacuna o un vehículo de administración de ADN.

Breve descripción de las figuras

A continuación, se describirán realizaciones no limitantes de la invención a modo de ejemplo únicamente y con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Replicón y vector pRIC3 de segunda generación. ColE1 ori, origen de replicación para *Escherichia coli*; RK2 ori, origen de replicación para *Agrobacterium tumefaciens*; bla, gen bla de resistencia a ampicilina/carbenicilina; LB y RB, bordes izquierdo y derecho para la integración del ADN-T; P35SS, promotor 35S del CaMV con potenciador transcripcional duplicado; CHS, región no traducida 5' de la chalcona sintasa; MCS, sitio de clonación múltiple, pA35S, señal de poliadenilación 35S del CaMV; LIR, región intergénica larga del BeYDV; SIR, región intergénica corta del BeYDV; rep, gen rep del BeYDV. La barra curva dentro de los mapas de plásmidos indica el ADN-T transferido a la célula vegetal durante la transfección.

Figura 2: Construcción de pRIC3-mSEAP y replicón. Plásmido de replicación autónoma pRIC3-mSEAP. (A) Etapas finales de clonación para crear pRIC3-mSEAP. (B) EF-1 α , promotor alfa del factor 1 de alargamiento; SEAP, gen de la fosfatasa alcalina secretada; PoliA del SV40, señal de poliadenilación del virus de simio 40. La barra curva dentro del mapa del plásmido indica ADN-T transfectado en células vegetales. (C) Replicón circularizado después de la liberación del ADN-T.

Figura 3: Construcción de pRIC3-mSEAP+ y replicón. pRIC3-mSEAP+ plásmido de replicación autónoma. (A) Etapas finales de clonación en la construcción de pRIC3-mSEAP+. (B) EF-1 α , promotor alfa del factor 1 de alargamiento; SEAP, gen de la fosfatasa alcalina secretada; PoliA del SV40, señal de poliadenilación del virus de simio 40; 35S del CaMV, región promotora del virus del mosaico de la coliflor, EGFP, gen de la proteína fluorescente verde mejorado; pA35SS, señal de poliadenilación 35S del CaMV. La barra curva dentro del mapa del plásmido indica ADN-T transfectado en células vegetales. (C) Replicón circularizado después de la liberación del ADN-T.

Figura 4: Construcción de pRIC3-mluc+ y replicón. Plásmido de replicación autónoma pRIC3-mluc+. (A) Etapas finales de clonación para crear pRIC3-mluc+. (B) CMV I/E/P + pCapR, región de intrón/potenciador/promotor de citomegalovirus con potenciador de pCapR; luc, gen informador de luciferasa de luciérnaga; poliA de BGH, señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino. 35S del CaMV, región promotora del virus del mosaico de la coliflor, EGFP, proteína fluorescente verde mejorada; pA35SS, señal de poliadenilación 35S del CaMV. La barra curva dentro del mapa del plásmido indica ADN-T transfectado en células vegetales. (C) Replicón circularizado después de la liberación de ADN-T.

Figura 5: Vector de expresión de *Agrobacterium* pTRAc. P35SS, promotor 35S del CaMV con potenciador transcripcional duplicado; CHS, región no traducida 5' de la chalcona sintasa; pA35S, señal de poliadenilación 35S del CaMV; SAR, región de unión al andamio del gen Rb7 del tabaco; LB y RB, los bordes izquierdo y derecho para la integración de ADN-T; ColE1ori, origen de replicación para *E. coli*; RK2ori, origen de replicación de *Agrobacterium*; bla, gen de resistencia a ampicilina/carbenicilina.

Figura 6: Principio de PCR inversa. Diagrama que ilustra el principio de PCR inversa. Cebadores (→) diseñados para amplificar solo el replicón de ADN recircularizado, pero no el vector original. Vector recircularizado en el LIR duplicado.

Figura 7: La amplificación por PCR de los replicones (A) pRIC3-mSEAP y pRIC3-mSEAP+ y (B) pRIC3-mluc+ muestra la liberación replicativa de ADN-T. MW, marcador de peso molecular; mSEAP, pRIC3-mSEAP; mSEAP+, pRIC3-mSEAP+, mluc+, pRIC3-mluc+, planta, ADN vegetal no infiltrado (control negativo).

Figura 8: Optimización de la expresión de L1 y L2. Prueba contrarreloj de los niveles de expresión de (A) hL1 y (B) hL2 en varios OD de infiltración, a 1-7 y 1-5 dpi, respectivamente. La proteína está indicada (→) a 55 kDa (hL1) y aproximadamente 65 kDa (hL2). MW, marcador de peso molecular, con tamaños indicados en kDa; +, hL1 crudo producido por plantas (A) y hL2 producido por bacterias (B).

Figura 9: Prueba contrarreloj de qPCR de vectores de replicación. Análisis de qPCR de ADN extraído de plantas infiltradas con (A) pRIC3-mSEAP, (B) pRIC3-mSEAP+ y (C) pRIC3-mluc+, 1-7 dpi. El número de copias se muestra como escala log10. Las barras de error indican el error estándar de la media (N = 3).

Figura 10: Expresión de elementos estructurales de PsV. Se utilizó PCR para confirmar la presencia de replicones (A) pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ y (B) pRIC3-mluc+ 3dpi, en plantas co-infiltradas con pTRAc-hL1, pTRAc-hL2 y pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ o pRIC3-mluc+, respectivamente. Una banda de aproximadamente 2,1 Kpb (→) indica liberación replicativa. MW, marcador de peso molecular, tamaños mostrados a la izquierda; PsV, extracto vegetal crudo; +, ADN únicamente (control positivo); -, ADN vegetal (control negativo). La transferencia Western para L1 (C) y L2 (D) confirma la presencia de ambas proteínas estructurales del VPH 4 dpi en el extracto crudo de plantas co-infiltradas con pTRAc-hL1, pTRAc-hL2 y pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ o pRIC3-mluc+. VLP, pTRAc-hL1 y pTRAc-hL2 solamente; mSEAP, PsV pRIC3-mSEAP, mSEAP+, PsV pRIC3-mSEAP+; mluc+, PsV pRIC3-mluc+; +, hL1 crudo producido por plantas (C) o L2 producido por bacterias (D); MW, marcador de peso molecular, tamaños indicados en kDa.

Figura 11: Ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio de VLP y PsV. El análisis de densitometría de las transferencias de puntos de L1 muestra la distribución de L1 después de la ultracentrifugación y el fraccionamiento en cloruro de cesio. Las transferencias de puntos (paneles de la izquierda) de las fracciones 1-19 de CsCl se sondearon con anticuerpo anti-L1 de CamVir-1. * en las transferencias de puntos y el panel gris en los gráficos, indican las fracciones agrupadas para diálisis; +, extracto vegetal crudo (control positivo). La densidad de las fracciones de CsCl (◆) se comparó con la intensidad relativa (□, unidades arbitrarias) de L1 (paneles de la derecha) para estimar la densidad de las partículas purificadas. (A) VLP de L1/L2, (B) pRIC3-mSEAP, (C) pRIC3-mSEAP+, (D) pRIC3-mluc+.

Figura 12: Purificación de PsV. Tinción de Coomassie (A, B) y transferencia Western para L1 (C, D) de varias etapas de purificación de PsV, separadas por SDS-PAGE. Las transferencias Western se sondearon para L1 usando el anticuerpo comercial anti-L1 CamVir-1. MW, marcador de peso molecular, tamaños mostrados a la derecha; C, extracto vegetal crudo; CsCl, fracciones de gradiente de cloruro de cesio agrupadas; dial., fracciones combinadas

dializadas, +, extracto crudo de hL1 (control positivo).

Figura 13: Micrografías electrónicas de PsV purificados. (A) y (E) pRIC3-mSEAP, (B) y (F) pRIC3-mSEAP+, (C) y (G) PsV pRIC3 mluc+ (página anterior) y (D) y (H) VLP de L1/L2 fueron purificados por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. El tamaño de los PsV purificados varió entre 30 y 120 nm de diámetro. Las flechas blancas indican partículas pequeñas (30-40 nm), las flechas grises indican partículas de PsV del VPH de tamaño estándar (50-60 nm) y las flechas negras indican partículas grandes (100-120 nm). (I) El extracto vegetal crudo sirve como control negativo. Se indican las barras de escala (panel izquierdo, 0,5 µm; panel derecho y (D), 200 nm, (I), 100 nm).

Figura 14: Presencia de ADN en PsV purificados. La amplificación por PCR del replicón (A) pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ y (B) pRIC3-mluc+ (2,1 Kpb, →) indica la presencia de ADN en partículas de PsV purificados después de la digestión con proteinasa K (PrK). MW, marcador de peso molecular; PrK +/-, digestión con PrK; PsV +, fracciones que contienen L1 agrupadas, PsV -, fracción que no contiene L1 (fracción 18); ADN, extracto de ADN de replicón (control positivo), V, VLP de L1/L2 purificadas digeridas con PrK (control negativo); P, ADN vegetal (control negativo).

Figura 15: Expresión del gen informador en células de mamífero pseudoinfectadas con PsV. (A) Expresión de SEAP 72 horas después de la transfección de pRIC3-mSEAP (plásmido) o pseudoinfección con mSEAP-PsV (PsV) en unidades de luz relativas (RLU), expresada en escala logarítmica (log10). (B) Expresión de SEAP para pRIC3-mSEAP+, como anteriormente. (C) expresión de luc para pRIC3-mluc+, como anteriormente. -ve, control negativo (solo medios). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las barras de error muestran la desviación estándar entre triplicados.

Figura 16: Casete de expresión de mamíferos mSEAP (SEQ ID NO: 8).

Figura 17: casete mSEAP+: casete de expresión que comprende un casete SEAP de mamífero y un casete EGFP de plantas (SEQ ID NO: 9).

Figura 18: casete de mluc+: casete de expresión que comprende un casete mluc de mamífero y un casete EGFP de plantas (SEQ ID NO: 10).

Figura 19: Estrategia de clonación para la inserción del origen de replicación de SV40 (SV40ori) en los vectores pRIC3-mSEAP y pRIC3-mSEAP+.

Figura 20: Expresión de SEAP en células de mamífero infectadas con PsV de mSEAP+ o mSEAP+ SV40ori. El control negativo son las células no infectadas. Los valores de SEAP están en unidades de luz relativas (RLU) y las diluciones de pseudovirión se dan en el eje X.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas, las realizaciones de la invención.

Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se utilizan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

Como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen la forma plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La terminología y fraseología utilizadas en este documento tienen el propósito de describir y no deben considerarse limitantes. El uso de los términos "que comprende", "que contiene", "que tiene" y "que incluye" y las variaciones de los mismos utilizados en este documento, pretende abarcar los elementos enumerados a continuación y sus equivalentes, así como elementos adicionales.

En el presente documento se proporciona un método para producir un pseudovirión del virus del papiloma humano (VPH) en una célula vegetal. Los "virus de papiloma" son virus de ADN de la familia *Papillomaviridae* que infectan la piel y las membranas mucosas de animales, preferiblemente mamíferos, e incluso más preferiblemente humanos. Una "VLP" o "partícula similar a virus" se refiere a la estructura similar a una cápside que resulta del ensamblaje de la proteína L1 del VPH sola o con la proteína de la cápside L2 del VPH. Estas estructuras son antigénica y morfológicamente similares a las partículas o viriones reales del virus del VPH. Las partículas similares a virus no incluyen material genético viral; en consecuencia, estas partículas no son infecciosas.

El término "pseudovirión" o "PsV" se refiere a una partícula similar al virus del papiloma que incluye las proteínas de la cápside del virus del papiloma en la que se ha encapsulado un plásmido o vector que contiene un gen heterólogo de interés. Los pseudoviriones de la invención contienen material genético no nativo que puede ser transferido por el virus a una célula animal, preferiblemente una célula de mamífero, y lo más preferiblemente a una célula humana. El material genético no nativo puede incluir un plásmido que codifica un gen terapéutico, un gen informador, un gen que codifica un polipéptido antigénico, tal como un gen que codifica constructos derivados de la oncoproteína E6 o E7 del VPH para tratar lesiones o carcinomas cervicales causados por los VPH, y o cualquier otro gen heterólogo de interés bajo el control de un promotor de mamífero, que se puede administrar a una célula de mamífero por el pseudovirión. En esta memoria descriptiva "encapsulado" se refiere al plásmido o vector que está encerrado dentro de la cápside de la partícula similar a virus.

Se debe leer que el término "proteína" incluye "péptido" y "polipéptido" y viceversa.

El método de la invención incluye las etapas de introducir un primer polinucleótido que codifica un polipéptido L1 del VPH y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido L2 del VPH en una célula vegetal. Se apreciará que el primer y segundo polinucleótidos pueden estar contenidos en un solo vector o en dos.

El término "vector" se refiere a algunos medios mediante los cuales se pueden introducir polinucleótidos o secuencias de genes en una célula. Hay varios tipos de vectores conocidos en la técnica que incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos y cósmidos. Generalmente, los polinucleótidos o secuencias de genes se introducen en un vector mediante un casete. El término "casete" se refiere a un polinucleótido o secuencias de genes que se expresa a partir de un vector, por ejemplo, el polinucleótido o secuencias de genes que codifican las proteínas L1 del VPH y L2 del VPH. Un casete generalmente comprende una secuencia de genes insertada en un vector, que en algunas realizaciones, proporciona secuencias reguladoras para expresar el polinucleótido o secuencias de genes. En otras realizaciones, el polinucleótido o la secuencia de genes proporciona las secuencias reguladoras para su expresión. En realizaciones adicionales, el vector proporciona algunas secuencias reguladoras y la secuencia de nucleótidos o de genes proporciona otras secuencias reguladoras. Las "secuencias reguladoras" incluyen, pero no se limitan a, promotores, secuencias de terminación de la transcripción, potenciadores, aceptores de empalme, secuencias donantes, intrones, secuencias de unión a ribosomas, secuencias de adición de poli(A) y/o orígenes de replicación.

El método incluye además la etapa de introducir una tercera secuencia de polinucleótidos en una célula vegetal. La tercera secuencia de polinucleótidos está en forma de replicón que está contenido dentro de un vector más grande. El replicón mismo contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido heterólogo de interés. Para que prosiga la amplificación del replicón que codifica el polipéptido heterólogo de interés, la liberación replicativa del replicón del vector más grande debe ocurrir en una célula vegetal. Una vez que se libera del vector más grande, el replicón, junto con un casete de expresión que comprende un polinucleótido o secuencias de genes que codifica el polipéptido heterólogo de interés, se replica adicionalmente hasta un alto número de copias en la célula vegetal. Debido a que los elementos estructurales de su polinucleótido forman el replicón que se libera del vector más grande, se recirculariza para formar un plásmido más pequeño que contiene el polinucleótido o secuencias de genes que codifica el polipéptido heterólogo de interés.

La coexpresión de los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH en la célula vegetal da como resultado que los polipéptidos L1 y L2 se autoensamblen en partículas similares a virus en la célula. Como resultado del alto número de copias del replicón en la célula, las copias del replicón se encapsulan directamente en las partículas similares a virus durante el ensamblaje en la célula para formar pseudoviriones. Esto contrasta con los métodos indirectos de incorporar un polinucleótido de interés en un pseudovirión separando química o mecánicamente las partículas similares a virus e introduciendo un polinucleótido de interés en la partícula similar a virus para formar un pseudovirión.

Se considera que el vector de replicación es incapaz de replicarse en una célula de mamífero, esto se debe al hecho de que, si bien la proteína Rep derivada del virus vegetal puede ser capaz de iniciar la replicación del replicón en una célula animal, preferiblemente una célula de mamífero, y lo más preferiblemente en una célula humana, en el sistema de vector descrito, la proteína Rep se expresa a partir de una secuencia promotora específica de planta que es muy poco probable que se reconozca en una célula de mamífero. Por otro lado, el gen que codifica el polipéptido heterólogo es, sin embargo, capaz de expresarse en una célula de mamífero porque está bajo el control de un promotor de mamífero bien caracterizado como parte del casete de expresión.

Una persona experta en la técnica apreciará que el gen que codifica la proteína Rep puede estar contenido en el vector de replicación, en otro vector (tal como un vector que contiene un casete que codifica el polipéptido L1 del VPH y/o L2 del VPH), puede integrarse además en el ADN de la célula vegetal en la que se producen los pseudoviriones, o puede integrarse, junto con un promotor adecuado, en el ADN de una célula de mamífero en la que el pseudovirión introduce el vector portador. La presencia de la proteína Rep en la célula vegetal o de mamífero puede dar como resultado el inicio de la replicación del vector de replicación y la producción del replicón con un alto número de copias.

El gen que codifica el polipéptido heterólogo contenido en el replicón puede incluir un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen informador, un gen terapéutico y posiblemente otros genes relacionados con proteínas de vacunas humanas o animales deseables, tales como L1 o L2 del VPH, Gag o Env del VIH y otros.

Se apreciará que un "gen informador" puede seleccionarse de cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido o proteína cuya actividad de transcripción, traducción y/o postraducción se pueda detectar. Los ejemplos de genes informadores incluyen genes para luciferasa, fosfatasa alcalina secretada, proteína fluorescente verde, beta-galactosidasa y similares. La expresión del polipéptido informador se usa en la presente invención como indicador de la presencia de anticuerpos neutralizantes del VPH en una muestra. Por lo tanto, los pseudoviriones de la invención pueden usarse en un ensayo de neutralización para la detección de anticuerpos neutralizantes del VPH en un sujeto.

Se describe en el presente documento que el replicón puede derivarse de cualquier virus de ADN monocatenario de plantas, incluidos geminivirus y nanovirus, así como de circovirus de aves y mamíferos, o de parvovirus, y/o virus de ADNcs bacterianos o plásmidos bacterianos que se replican a través de una estrategia similar de replicación de ADN en círculo rodante. Todo lo que se requiere es una proteína Rep o equivalente, expresada en presencia de un constructo de ADN transportado en un plásmido más grande, que incorpora al menos un origen de secuencia de

replicación (Ori) reconocido por Rep para permitir el inicio de la replicación en círculo rodante.

El ensayo de neutralización de pseudoviriones de la invención podría usarse para el desarrollo de un kit de neutralización de pseudovirus del VPH que podría usarse para probar la eficacia de posibles candidatos a vacunas del VPH.

El suministro del replicón desde el pseudovirión a una célula de mamífero es un indicador claro de que los pseudoviriones de la invención son capaces de usarse como vehículos de suministro de ADN con fines de terapia génica.

La producción de los pseudoviriones de la invención en plantas tiene ciertos beneficios sobre los métodos actuales de producción de células de mamíferos. Entre otros, el coste de producción de pseudoviriones derivados de plantas es sustancialmente más bajo que el coste de producción en células de mamífero. Actualmente, los pseudoviriones solo se producen en células cultivadas derivadas de cáncer de mamíferos: este método de producción plantea ciertos problemas de seguridad en el sentido de que los pseudoviriones podrían encapsular oncogenes de las líneas celulares. Esto podría resultar en que un sujeto que es tratado con estos pseudoviriones se "infecte" con genes causantes de cáncer. Además, la propagación de pseudoviriones en líneas celulares de mamíferos podría dar como resultado que otros virus y/o contaminantes queden encapsulados en la cápside.

El método de producción de los pseudoviriones de la invención en plantas es un proceso simple y elimina la posibilidad de contaminación por oncogén o virus de mamíferos. El proceso también es altamente escalable. Además, si el ADN de replicación derivado de virus de plantas se encapsula en los pseudoviriones de la invención, este ADN derivado de virus de plantas no será capaz de replicarse en células de mamíferos o de combinarse con otros virus de mamíferos o secuencias de tipo transposón.

Los siguientes ejemplos se ofrecen ahora a modo de ilustración y no a modo de limitación de la invención descrita en el presente documento.

Ejemplo 1

Producción de replicones en plantas

Vectores de expresión en plantas

Para expresar pseudoviriones (PsV) en plantas de *N. benthamiana*, se utilizaron varios vectores de expresión de plantas. Se construyeron vectores de replicación que se replicarían *in planta* para formar replicones o pseudogenomas para el empaquetamiento por las proteínas de la cápside L1 y L2 del VPH en PsV. Los vectores de replicación se construyeron adaptando el vector pRIC3 derivado de geminivirus desarrollado previamente (Figura 1) para producir los vectores de replicación. Se utilizaron dos casetes de expresión de mamíferos diferentes que codifican genes para los productos del gen informador SEAP (casete de mSEAP) y luc (casete de mluc) para crear los vectores de replicación. Ambos casetes de mamíferos se incorporaron en pRIC3 con el casete de plantas EGFP existente (+), en lo sucesivo denominado mSEAP+ (SEQ ID NO: 9; Figura 17) y mluc+ (SEQ ID NO: 10; Figura 18) que sirven para aumentar el tamaño total del replicón (pRIC3-mSEAP+ y pRIC3-mluc+), mientras que el casete de SEAP (SEQ ID NO: 8; Figura 16) también se incorporó en lugar del casete de la planta para crear un replicón más pequeño (pRIC3-mSEAP). Se ha informado que las VLP del VPH empaquetan pseudogenomas de aproximadamente 5-8 Kpb de tamaño, mientras que los pseudogenomas más grandes o más pequeños no están empaquetados en absoluto (Buck et al., 2004; Touze y Coursaget, 1998). Para adaptarse a estas limitaciones de tamaño, se crearon tres vectores con diferentes genes informadores que dieron como resultado, replicones de diferentes tamaños, a saber:

- a) pRIC3-mSEAP: pRIC3 con un casete de mamífero que codifica el gen informador de SEAP en lugar del casete de la planta actual (replicón/pseudogenoma de 4,8 Kpb) (Figura 2)
- b) pRIC3-mSEAP⁺: pRIC3 con la adición de un casete de SEAP de mamífero, insertado secuencia arriba del casete de la planta (replicón/pseudogenoma de 6,6 Kpb) (Figura 3)
- c) pRIC3-mluc⁺: pRIC3 con la adición de un casete de mamífero alternativo que codifica el gen informador luc, insertado secuencia arriba del casete de la planta (replicón/pseudogenoma de 7,6 Kpb) (Figura 4).

Además de estos, el vector de expresión vegetal pTRAc (donado por el Prof. Dr. Rainer Fischer; Instituto Fraunhofer de Biología Molecular y Ecología Aplicada, Alemania) que expresa genes de codón optimizado humanos L1 de VPH-16 (SEQ ID NO: 13) o L2 de VPH 16 (SEQ ID NO: 14) (pTRAc-hL1 y pTRAc-hL2, respectivamente) se usaron para la producción de proteínas de la cápside L1 y L2. Este vector, que se muestra en la Figura 5, se dirige a la expresión de L1 y L2 al citoplasma, y pTRAc-hL1 ha demostrado altos niveles de expresión para L1 *in planta* (Maclean et al., 2007).

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se aislaron plásmidos de *E. coli* usando un kit Miniprep de plásmidos QIAGEN®. A continuación, se introdujeron en la cepa GV3101:: pMP90RK de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación, como lo describen Maclean et al.

(2007). Las células de *A. tumefaciens* se hicieron electrocompetentes mediante el método descrito por Shen y Forde (1989). Se añadieron 200 ng de ADN plasmídico a una cubeta de electroporación enfriada (Molecular BioProducts, Inc.), junto con 100 µl de células electrocompetentes. Después de 5 minutos de incubación en hielo, las células se electroporaron usando un GenePulser^{MR} de Bio-Rad en las siguientes condiciones: 1,8 kV, 25 µF, 200 Ω. Se añadieron 900 µl de caldo Luria sin antibióticos a las células electroporadas, que se incubaron durante 2 horas a 27 °C. Los clones recombinantes se cribaron mediante selección de antibióticos con rifampicina (50 µg/ml), carbenicilina (50 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml). Las placas se incubaron a 27 °C durante 48 horas para permitir la formación de colonias y se seleccionaron para detectar clones positivos mediante PCR de colonias.

10 Agroinfiltración de *N. benthamiana*

La agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* se realizó como lo describen Maclean et al. (2007). Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en una sala de crecimiento de plantas controlado. Las plantas se cultivaron a 22 °C, con 16 horas de luz al día durante 6 semanas. Las plantas se agroinfiltraron mediante jeringa o al vacío con una suspensión bacteriana de *A. tumefaciens* recombinante a una densidad óptica (OD) de 0,25, 0,5, 0,75 o 1. Brevemente, se utilizó una jeringa para forzar la suspensión bacteriana de *A. tumefaciens* en los espacios de aire abaxiales en varias hojas por planta. Se permitió que las plantas crecieran normalmente y se recolectaron muestras de hojas a los 1-7 días después de la infiltración (dpi). Para la infiltración al vacío, las plantas enteras se sumergieron en 500 ml de suspensión bacteriana y se colocaron en una cámara de vacío. Se mantuvo un vacío de -90 kilopascales (kPa) durante 5 segundos, luego se liberó rápidamente (10-15 kPa.seg⁻¹). Las plantas se cultivaron normalmente y se recolectaron a 4 dpi.

PCR cuantitativa

Se realizó un análisis de qPCR para determinar si estaba ocurriendo la replicación del replicón en las plantas. Se incubó un solo disco de hoja de 0,5 cm a 95 °C durante 10 minutos con 100 µl de tampón de extracción del kit de PCR para plantas Extract-N-Amp (Sigma Aldrich). Este se diluyó con 100 µl de tampón de dilución y se almacenó a -20 °C hasta que se necesitó. La qPCR se realizó usando la mezcla lista SybrGREEN 2x del mismo kit. Se usaron los cebadores lucQ-F (5'-CAA CTG CAT AAG GCT ATG AAG AGA-3' (SEQ ID NO: 1)) y lucQ-R (5'-ATT TGT ATT CAG CCC ATA TCG TTT-3' (SEQ ID NO: 2)) para amplificar un fragmento de 153 pb del gen de la luciferasa y se usaron los cebadores SEAPQ-F (5'-CCT TGA CCC CGC ACA GGT A-3' (SEQ ID NO: 3)) y SEAPQ-R (5'-GGC TCT GTC CAA GAC ATA CAA TGT A-3' (SEQ ID NO: 4)) para amplificar un fragmento de 83 pb del gen de SEAP. Todos los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0,4 mM. El ciclado de qPCR se realizó en un Corbett RotorGene 6000 (Corbett), usando los parámetros de ciclado como sigue: para la reacción con luciferasa 95 °C durante 2 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 57 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 segundos; y análisis de la curva de fusión desde 72-95 °C durante 5 segundos por grado y para la reacción de SEAPQ 95 °C durante 2 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 54 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 segundos; y el análisis de la curva de fusión desde 72-95 °C durante 5 segundos por grado. La qPCR se realizó con tres repeticiones técnicas por muestra, con un tamaño de población de muestra de tres (N = 3). Los datos se analizaron utilizando el software RotorGene Q Series 2.0.2 (Corbett). Los valores de Ct se normalizaron a la concentración total de ADN para cada muestra.

PCR inversa

El constructo del replicón de la presente invención se derivó del genoma del Mastrevirus del enano amarillo del frijol (BeYDV). Esto incluye dos copias de la región intergénica larga (LIR) de BeYDV, que flanquean un constructo que comprende un promotor de mamífero en el lado 5' de un gen informador, una región intergénica corta (SIR) derivada de BeYDV y el gen de Rep de BeYDV bajo el control de su promotor nativo en la secuencia LIR. La introducción del plásmido portador en células vegetales da como resultado la transcripción del promotor Rep de BeYDV del ARNm de Rep y la traducción de la proteína Rep. Esta proteína se une al BeYDV Ori dentro de las secuencias de LIR y provoca una muesca de una sola cadena en la secuencia 5'-TAATATT/AC-3'; las polimerasas reparadoras del huésped extienden el extremo 3' libre hasta la segunda secuencia TAATATTAC de LIR. La liberación de un ADN del replicón monocatenario de longitud unitaria permite la recircularización a través de una secuencia de tallo-bucle codificada en la LIR, con la ligación a una molécula circular por las moléculas de ADNcs circulares de proteína Rep se convierten en ADNcd por polimerasas huésped y Rep puede entonces transcribirse a partir de estas para amplificar su presencia como replicones autónomos, al igual que el virus nativo se replica. Alternativamente, se puede generar un replicón mediante la expresión en trans de una proteína Rep a partir de otro constructo coagroinfiltrado, y la replicación continuaría sólo mientras se coexpresara Rep.

Este proceso ocurre en células vegetales porque el promotor Rep nativo es reconocido por factores de transcripción de plantas: esto no parece suceder en células de mamíferos, lo que significa que el replicón sería replicacionalmente inerte y solo se transcribiría para permitir la expresión del transgén.

Una variación de la PCR inversa, como describen Regnard et al. (2010), se utilizó para confirmar la recircularización del replicón (Figura 6). Los cebadores se diseñaron para amplificar un fragmento de ADN (aproximadamente 2,1 Kpb) que abarca el sitio de recircularización de cada replicón. Las reacciones de PCR para confirmar la recircularización del replicón pRIC3mluc+ se realizaron con el kit GoTaq (Promega), Mg²⁺ 2,5 mM, cebadores poliA35SS-F (5'-AGG

GTT CTT ATA GGG TTT CGC TC-3' (SEQ ID NO: 5)) y CMV-R (5'-CCC TGT AAC GTA TGT GAG A-3' (SEQ ID NO: 6)), en las siguientes condiciones: 95 °C durante 3 minutos; 25 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1-3 minutos; y 72 °C durante 5 minutos. Las reacciones de PCR para confirmar la recircularización del replicón pRIC3mSEAP y el replicón pRIC3mSEAP+ se realizaron con el kit GoTaq (Promega), Mg²⁺ 2,5 mM, cebadores Rep-F (5'-TCC ATC GTG CGT CAG ATT TGC G-3' (SEQ ID NO: 7)) y SEAPQ-R (SEQ ID NO: 4), en las siguientes condiciones: 95 °C durante 3 minutos; 25 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1-3 minutos; y 72 °C durante 5 minutos.

Los vectores replicantes experimentan liberación replicativa en plantas

Los tres nuevos vectores, pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ y pRIC3-mluc+ se diseñaron y probaron en *N. benthamiana*. Los tres vectores se clonaron en *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK y las plantas se infiltraron a una OD₆₀₀ de 0,5. El ADN se recogió de las plantas a los 3 dpi y se analizó la liberación replicativa mediante PCR. Los cebadores se diseñaron para amplificar un fragmento de 2,1 Kpb del replicón, incorporando la LIR (véase las Figuras 2C, 3C y 4C) usando las reacciones de PCR inversa descritas anteriormente para pRIC3mluc+, pRIC3-mSEAP y pRIC3-mSEAP+. De acuerdo con el diseño de este experimento, el producto de amplificación por PCR solo se produciría en presencia de replicón recircularizado. La amplificación por PCR (Figura 7) de un producto de aproximadamente 2,1 Kpb confirmó que el replicón se formó en plantas infiltradas individualmente con pRIC3-mSEAP y pRIC3-mSEAP+ (Figura 7A) y pRIC3-mluc+ (Figura 7B). Esto confirma que estos vectores forman un replicón recircularizado en las células vegetales y son vectores adecuados para la producción del pseudogenoma.

Se ha demostrado previamente que el esqueleto del vector pRIC3 forma replicones que se replican hasta un alto número de copias dentro de la célula vegetal, en relación con el vector pTRAc no replicante (Regnard et al., 2010). Las plantas se infiltraron individualmente con cada vector de replicación hasta una OD 0,5 y el ADN se recogió a los 1, 3, 5 y 7 dpi. Se usó qPCR para determinar el aumento en el número de copias del replicón desde 1 a 7 dpi con cada uno de los vectores de replicación usando las reacciones y condiciones de reacción descritas anteriormente para pRIC3-mluc+, y pRIC3-mSEAP y pRIC3-mSEAP+, respectivamente. El análisis mostró un aumento de 100-1000 veces en el número de copias de genes para los tres vectores a los 1 a 3 dpi, con mantenimiento en un número de copias similar hasta de 7 dpi (Figura 9). pRIC3-mSEAP (Figura 9A), pRIC3-mSEAP+ (Figura 9B) y pRIC3-mluc+ (Figura 9C) muestran todos aumentos muy similares en el número de copias. Esto es consistente con observaciones previas para pRIC y pRIC3 (Ogle, 2008; Regnard et al., 2010).

Se ensayó la capacidad de los tres vectores para replicarse de forma autónoma en plantas. El análisis de PCR confirmó que se formaron los replicones apropiados como se esperaba. Para dilucidar si los vectores de replicación autónoma estaban, de hecho, produciendo un alto número de copias de los replicones *in planta*, se empleó el análisis de qPCR. El análisis de qPCR de muestras de ADN recolectadas hasta 7 dpi mostró que el número de copias del replicón para todos los plásmidos se amplificó entre 100 y 1000 veces entre 1 y 3 dpi, y que este alto número de copias se mantuvo hasta 7 dpi. Esto es similar a los resultados obtenidos por Regnard et al. (2010), quienes mostraron un aumento casi idéntico en los vectores pRIC utilizados para generar replicones que codifican el gen p24 del VIH o EGFP. Los vectores de replicación desarrollados por otros grupos han demostrado aumentos similares en el número de copias del replicón (Huang et al., 2009; Zhang y Mason, 2006). Nuestro resultado demuestra que el uso de estos vectores de replicación para la generación de altas cantidades de ADN del replicón en plantas es una estrategia factible para producir suficiente ADN de pseudogenoma en células huésped de plantas para la producción de PsV.

Ejemplo 2

Producción de PsV *in planta*

SDS-PAGE y transferencia Western

Se realizó SDS-PAGE para analizar la producción de proteínas hL1 y hL2 del VPH-16 en plantas. La proteína se extrajo de plantas agroinfiltradas con pTRAc-hL1 y/o pTRAc-hL2 de *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK. Brevemente, se recolectaron tres discos de hojas de 0,5 cm a 1, 3, 5 y 7 dpi, se congelaron en N₂ líquido y se molieron en un tubo de microcentrifuga usando un mortero de plástico. Se añadieron 100 µl de NaCl 0,5 M en PBS con un cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA completo 1x (Roche) (hL1) o urea 8 M en H₂O (hL2) al material de la hoja molida y se mezcló completamente. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos y se reservó el sobrenadante. Se repitió esta etapa de centrifugación y se almacenó el sobrenadante a -20 °C. Para el análisis SDS-PAGE, se añadieron 8 µl de colorante de carga 5x que contenía β-mercaptoetanol a 32 µl de proteína soluble, y las muestras se incubaron a 95 °C durante 7 minutos. A continuación, se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% utilizando el sistema de SDS-PAGE Mini-PROTEAN® Tetra (Bio-Rad) y se sometieron a electroforesis a 130 V durante aproximadamente 120 minutos. Estos geles y membranas de nitrocelulosa se equilibraron durante 10 minutos en tampón de transferencia antes de ser transferidos a una membrana de nitrocelulosa a 15 V durante 90 minutos usando una celda de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot® SD de Bio-Rad. Las membranas se incubaron con tampón de bloqueo durante 60 minutos, luego se sondearon para L1 durante la noche, usando anticuerpo monoclonal primario CamVir-1 comercialmente disponible (Abcam, ab69) diluido 1 en 10000 en tampón de bloqueo. Las membranas se lavaron durante 4x10 minutos en tampón de bloqueo, se sondearon con anticuerpo secundario de

cabra conjugado con anti-AP de ratón (Sigma, A3562) diluido 1 en 5000 en tampón de bloqueo durante dos horas, se lavaron 4x10 minutos en tampón de bloqueo sin leche desnatada en polvo y se visualizaron utilizando sustrato de fosfatasa BCIP/NBT (KPL). Para L2, se utilizó un protocolo similar. El anticuerpo primario fue suero policlonal primario anti-L2 producido en conejo producido en nuestro laboratorio y usado a una dilución de 1 en 5000, y el anticuerpo secundario fue anticuerpo de cabra conjugado con anti-AP de conejo (Sigma, A3687).

Optimización de la expresión de proteína en plantas.

La expresión de hL1 y hL2 se optimizó mediante una prueba de tiempo de 1-7 dpi. Las plantas se agroinfiltraron con un intervalo de valores de OD₆₀₀ (0,25-1,0) en suspensión bacteriana. La proteína se recogió a 1, 3, 5 y 7 dpi y se separó mediante SDS-PAGE. La expresión de hL1 y hL2 se analizó mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal CamVir-1 anti-L1 y un anticuerpo policlonal anti-L2 producido en conejos (Figura 8), respectivamente. Se detectó la expresión de proteína recombinante en todos los valores de OD₆₀₀ probados, desde 3 dpi, tanto para hL1 como para hL2, en el tamaño esperado. Si bien L2 es una proteína de aproximadamente 50 kDa, se ha observado ampliamente que migra a aproximadamente 80 kDa (Muller et al., 1995). La expresión más alta detectada para hL1 fue a OD₆₀₀ 0,25, de 3-7 dpi (Figura 8A). La expresión más alta de hL2 también se observó en aquellas plantas infiltradas a una OD₆₀₀ de 0,25, a 3 dpi (Figura 8B). Como tal, se eligieron parámetros de agroinfiltración de OD₆₀₀ 0,25 a 4 dpi para la expresión óptima de hL1 y hL2 en experimentos adicionales.

Producción de PsV en plantas

Para producir PsV del VPH, se coinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con pTRAc-hL1, pTRAc-hL2, junto con cada uno de pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ y pRIC3-mluc+, por separado. De acuerdo con los datos demostrados anteriormente, la agroinfiltración con vectores pTRAc tuvo una OD₆₀₀ de 0,25, mientras que los vectores replicantes se agroinfiltraron a una OD₆₀₀ de 0,5 y las partículas se recolectaron a los 4 dpi. pTRAc-hL1 y pTRAc-hL2 también se infiltraron conjuntamente sin un vector de replicación, con la intención de producir VLP de L1/L2 del VPH. Esto se realizó mediante infiltración al vacío para la producción de grandes volúmenes de biomasa. El ADN y la proteína cruda se extrajeron a los 4 dpi, con el fin de confirmar la presencia de todos los componentes necesarios para la formación de PsV mediante PCR y transferencia Western (Figura 10). La amplificación por PCR de un fragmento de 2,1 Kpb confirmó que se estaba produciendo la formación de replicones para los tres constructos de replicación a los 4 dpi (Figura 10, paneles A y B). Los carriles demarcados 'PsV' indican la formación de replicones en plantas coinfiltradas con pTRAc-hL1 y pTRAc-hL2, mientras que las marcadas con '+' son de plantas infiltradas con solo vector de replicación, y sirven como control positivo. El análisis de transferencia Western con CamVir-1 (hL1) y un anticuerpo policlonal de conejo (hL2) confirmó la expresión de L1 (Figura 10C) y L2 (Figura 10D) a los 4 dpi, en plantas infiltradas con solo L1 y L2 ('VLP'), o L1 y L2 coinfiltrados con un vector de replicación ('mSEAP', 'mSEAP+' y 'mluc+'). Esto se confirmó de forma independiente en al menos tres experimentos de coinfiltración separados. En particular, la intensidad de la banda correspondiente a L2 (Figura 10D) mostró una marcada variabilidad entre las repeticiones en todos los constructos.

La producción de PsV del VPH-16 en plantas fue satisfactoria para cada uno de los tres vectores de replicación construidos. Este trabajo se basó en los hallazgos de varios artículos anteriores, en particular el de Maclean et al., (2007). Ese estudio demostró que la L1 humanizada se expresaba a niveles altos y se ensamblaba espontáneamente en VLP *in planta* utilizando el vector pTRAc. Esto, junto con los resultados no publicados para pTRAc-hL2 del mismo grupo, demostró la viabilidad de estos vectores para la producción de partículas del VPH en plantas.

Se ha demostrado ampliamente que tanto L1 como el L2 del VPH son necesarios para el empaquetamiento eficaz del ADN en el virión del VPH, tanto en viriones naturales como en PsV (Ma et al., 2011; Okun et al., 2001; Stauffer et al., 1998). Además, se estableció recientemente que la presencia de L2 en la cápside de PsV aumenta diez veces la eficiencia de empaquetamiento del ADN (Holmgren et al., 2005). En este estudio, tanto L1 como L2 se expresaron conjuntamente para permitir la máxima encapsulación de ADN potencial. No se realizaron investigaciones sobre empaquetamiento diferencial en presencia y ausencia de L2; sin embargo, se observó poca o ninguna señal de L1 en las fracciones 14-16 (densidad de flotación 1,26-1,28 g/ml, correspondiente a la densidad de las VLP sin ADN encapsulado). Esta falta de partículas "ligeras" sugiere que el empaquetamiento del ADN por las partículas del VPH en las plantas es realmente muy eficiente, lo que da como resultado pocas o ninguna partícula sin ADN encapsulado. Esto contrasta con otros métodos de producción de PsV, todos los cuales muestran un pico correspondiente a partículas "ligeras" o VLP. Esto es particularmente cierto para el método de desmontaje-reensamblaje de VLP (como lo demuestran Touze y Coursaget (1998)), que generalmente tiene una eficiencia de empaquetamiento muy por debajo del 50% (Touze y Coursaget, 1998; Unckell et al., 1997).

Este empaquetamiento eficiente es una clara ventaja para el enfoque de producción de plantas, aunque esto debe moderarse con la observación de que no todo el ADN empaquetado es necesariamente ADN de pseudogenoma. Esto se demuestra claramente por las VLP de L1/L2 producidas en el presente documento, que se consideró que eran en su mayoría partículas "pesadas", lo que indica ADN encapsulado. Como estos se produjeron en ausencia de un vector de replicación, el ADN empaquetado fueron o bien los plásmidos pTRAc usados para producir VLP o ADN vegetal misceláneo. Tanto pTRAc-hL1 como pTRAc-hL2 (7,7 Kpb y 7,5 Kpb, respectivamente) caen por debajo del tamaño máximo de 7,9-8 Kpb para pseudogenomas que pueden empaquetarse eficazmente en PsV de L1/L2 del VPH (Buck

et al., 2005b; Touze y Coursaget, 1998). Es posible que estos plásmidos, o ADN misceláneo, estuvieran empaquetados para ensamblar partículas del VPH en lugar del ADN del replicón pretendido; se ha sugerido que las VLP producidas en células de mamíferos encapsulan ADN celular misceláneo (Roden et al., 1996). En cualquier caso, la replicación extremadamente eficiente observada en los tres vectores de replicación utilizados en el presente documento, así como aquella observada cuando se comparó pRIC con pTRAc en un estudio anterior (Regnard et al., 2010), sugieren que la gran mayoría de plásmidos presentes en la planta durante el ensamblaje de PsV serían los pseudogenomas informadores. Como tal, la posibilidad de empaquetar plásmidos pTRAc puede no tener ninguna relevancia para el resultado de este estudio. El trabajo futuro para dilucidar todas las especies de ADN encapsuladas en PsV producidas en plantas es importante para una comprensión completa del proceso de ensamblaje de PsV *in planta*, así como para su uso en ensayos de neutralización.

Los análisis estructurales de L1 y L2 sugieren que el ADN se asocia de manera inespecífica, basándose en el pH general y la carga de los motivos estructurales internos (Fay et al., 2004; Garcea y Gissmann, 2004; Li et al., 1997; Pereira et al., 2009). Presumiblemente, esto permite el ensamblaje de PsV *in vitro*, demostrado por varios investigadores, en ausencia de factores celulares de mamíferos (Oh et al., 2004; Shi et al., 2001; Touze y Coursaget, 1998). En células de mamíferos, existe evidencia que sugiere que las chaperonas (particularmente las carioferinas) juegan un papel en el ensamblaje y empaquetamiento del ADN de los viriones naturales del VPH, y parece probable que estos sean responsables de la producción intracelular eficiente de PsV (Bird et al., 2008; Chromy et al., 2006). Se ha demostrado que las chaperonas, en particular la proteína 70 de choque térmico (Hsp70) y las carioferinas, desempeñan un papel en el ensamblaje de varios virus, incluidos virus de plantas (Kunik et al., 1999; Sullivan y Pipas, 2001). Curiosamente, se ha demostrado que la proteína de unión (BiP) de la chaperona asociada al ER participa en el plegado y ensamblaje de anticuerpos recombinantes en plantas transgénicas (Nuttall et al., 2002). Estos datos sugieren que la maquinaria molecular requerida para el ensamblaje del virus del papiloma y la encapsulación del ADN se conserva en todos los sistemas eucariotas y es responsable del ensamblaje eficaz de PsV observado en el presente documento.

Ejemplo 3

Purificación de pseudoviriones

Extracción y purificación de partículas

Para producir partículas, las plantas se infiltraron al vacío con *A. tumefaciens* GMV3101::pMP90RK que contenía pTRAc-hL1, pTRAc-hL2 y pRIC3luc, pRIC3mSEAP o pRIC3mSEAP+. La proteína y el ADN se recogieron a los 4 dpi, como se describió anteriormente. Se usó transferencia Western, como se describió anteriormente, para confirmar la presencia de proteína L1 y L2, y se usó PCR inversa, como se describió anteriormente, para confirmar que había tenido lugar la liberación replicativa. Las plantas enteras se recolectaron a los 4 dpi. Las partículas se purificaron siguiendo una variación del protocolo descrito por Varsani et al. (2003), con algunas modificaciones. Las hojas enteras se pesaron y se molieron con nitrógeno líquido en un mortero con pistilo o se maceraron completamente a temperatura ambiente. Se añadió NaCl 0,5 M en PBS frío al material de la hoja en una proporción de 1:2 (p:v) y las muestras se homogeneizaron en un mezclador de alto cizallamiento T25 Ultra-Turrax (IICA®) a 13000 rpm durante 10 minutos en hielo. El homogeneizado se mantuvo sobre hielo durante 2 horas más antes de centrifugarlo a 8000 g durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J25i con un rotor Beckman JA-14. El sobrenadante se filtró a través de 4 capas de Miracloth (Calbiochem) y se colocó en capas sobre una almohadilla de 7 ml de sacarosa al 40% (p/v). Las muestras se centrifugaron a 100000 g durante 3 horas a 4 °C en una centrífuga Optima^{MR} L-100 XP (Beckman Coulter) con un rotor Beckman Coulter SW32Ti. Se eliminaron el sobrenadante y la almohadilla de sacarosa, el sedimento se resuspendió en 1 ml de CsCl 0,4 g/ml en PBS y se aclaró en una centrífuga de mesa Eppendorf 5424 a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se diluyó en 5 ml de CsCl 0,4 g/ml en PBS y se sometió a centrifugación a 100000 g durante 24 horas en una ultracentrífuga L-100 XP con un rotor Beckman SW55Ti a 10 °C.

Identificación de las VLP y pseudoviriones en gradiente de CsCl

Después de la centrifugación, el gradiente de CsCl se fraccionó manualmente o usando un fraccionador Foxy Jr. (ISCO). La densidad de cada fracción se determinó usando un refractómetro de mano (ATAGO) para leer el índice de refracción a 25 °C, y se usaron tablas críticas internacionales (Kellogg, 1927) para convertir el índice de refracción en densidad de flotación.

Se realizó una transferencia de puntos para confirmar la presencia de L1 en las fracciones de CsCl. Brevemente, se dejó caer 1 µl de cada fracción sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó durante 30 minutos en tampón de bloqueo, luego se sondeó L1 como se describió anteriormente. Las membranas se escanearon y analizaron utilizando el software de densitometría GeneTools (SynGene), y la intensidad relativa del punto se normalizó a la presencia de L1 en el extracto crudo de la planta. Las fracciones positivas para L1 se combinaron y se dializaron durante la noche contra NaCl 0,5 M en PBS para eliminar el CsCl.

Para confirmar la presencia del replicón de ADN en los PsV, se añadió Proteinasa K a las fracciones, que se incubaron a 55 °C durante 3 horas para permitir la digestión completa de la cubierta de la proteína del PsV, antes de someterse

a inactivación a 95 °C durante 10 minutos. Se utilizó PCR inversa para amplificar un fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 Kpb de las muestras, para las reacciones del replicón pRIC3mluc+ se realizaron con el kit GoTaq (Promega), Mg²⁺ 2,5 mM, cebadores polyA35SS-F (5'-AGG GTT CTT ATA GGG TTT CGC TC-3' (SEQ ID NO: 5)) y CMV-R (5'-CCC TGT AAC GTA TGT GAG A-3' (SEQ ID NO: 6)), bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 3 minutos; 25 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1-3 minutos; y 72 °C durante 5 minutos. Las reacciones de PCR para confirmar la recircularización del replicón pRIC3mSEAP y el replicón pRIC3mSEAP+ se realizaron con el kit GoTaq (Promega), Mg²⁺ 2,5 mM, cebadores Rep-F (5'-TCC ATC GTG CGT CAG ATT TGC G-3' (SEQ ID NO: 7)) y SEAPQ-R (SEQ ID NO: 4), bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 3 minutos; 25 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1-3 minutos; y 72 °C durante 5 minutos.

Microscopía electrónica

Para confirmar la presencia de VLP y PsV, se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las rejillas de cobre se hicieron hidrófilas mediante descarga luminiscente usando un controlador de etapa fría SmartSet Modelo 900 (Electron Microscopy Sciences) a 25 mA durante 30 segundos. Las rejillas se incubaron durante 1-30 minutos con muestras de VLP o PsV, se lavaron tres veces con dH₂O y las partículas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (p/v). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai F20 (FEI) o un microscopio electrónico de transmisión LEO912 (Zeiss) con un aumento de 14500X, 19000X o 50000X. Se capturaron 10 campos de visión con un aumento de 50000X para todas las muestras, y se capturaron tres campos de visión con un aumento de 19000X para las muestras de VLP de L1/L2 y 14500X para las muestras de PsV.

Purificación e identificación de PsV producidos por plantas

Una vez confirmada la presencia de todos los elementos necesarios que comprenden los PsV en plantas infiltradas (proteína L1, proteína L2, así como los replicones mSEAP, mSEAP+ y mluc+), se aislaron las VLP y los PsV a partir del extracto de planta crudo utilizando variaciones del método descrito por Varsani et al., (2003). Brevemente, el material vegetal homogeneizado que contiene PsV se sometió a ultracentrifugación en una almohadilla de sacarosa al 40%. El sedimento resultante se resuspendió en 0,4 g/ml de CsCl en PBS y se sometió a ultracentrifugación isopícnica para separar las partículas sobre la base de la densidad de flotación.

Después de la centrifugación, las muestras se fraccionaron y analizaron para detectar la presencia de L1 mediante transferencia de puntos, utilizando CamVir-1 anti-L1, ya que se pensó que esto indicaría la presencia de las VLP y los PsV como resultado de su asociación con L1, un componente vital de estas partículas. El análisis de densitometría de la señal de L1 en las transferencias de puntos indicó la presencia de VLP o PsV putativos del VPH, y se comparó con la densidad de flotación de cada fracción del gradiente, calculada como una función del índice de refracción (Figura 11). Trabajos anteriores han informado que las VLP de L1/L2 del VPH con ADN encapsulado (PsV) tienen una densidad de flotación de 1,32-1,34 g/ml, mientras que las VLP (sin ADN) tienen una densidad de flotación de 1,26-1,28 g/ml (Rossi et al., 2000; Touze y Coursaget, 1998). Se observó que L1 estaba presente en todas las fracciones, con un pico distinto en la señal correspondiente a una densidad de flotación de 1,33 g/ml, lo que sugiere que estas partículas contienen ADN encapsulado (Figura 11). Curiosamente, las VLP de L1/L2 demostraron un pico de L1 a una densidad de flotación de 1,30 a 1,33 g/ml, que corresponde a una partícula "pesada" (Figura 11A). Esto sugiere que estas partículas encapsularon el ADN con una eficacia similar a las que se infiltraron conjuntamente con los vectores de replicación. Se observó un pico secundario a una densidad de 1,25 g/ml en las VLP de L1/L2 (Figura 11B) y a una densidad de 1,27 g/ml en partículas purificadas de plantas infiltradas con pRIC3-mSEAP (Figura 11B). Esto sugiere que en estas dos muestras, se formaron pequeñas cantidades de partículas sin ADN encapsulado. Cada uno de estos resultados es representativo de al menos tres procedimientos de purificación separados. Las fracciones 8-11 se combinaron y dializaron contra PBS con alto contenido de sal para obtener PsV purificados, y las fracciones 17-18 se combinaron y dializaron como un control sin PsV. Estos se utilizaron para análisis adicionales mediante microscopía electrónica, transferencia Western y PCR.

La Figura 12 muestra varias etapas clave en el proceso de purificación, separadas en un gel de SDS-PAGE. La tinción de Coomassie revela la eliminación de la mayoría de los contaminantes proteicos de las muestras purificadas (Figura 12A y 12B). Una banda de proteína está presente a aproximadamente 55 kDa en muestras purificadas tanto en la Figura 12A como en la 12B, que probablemente sea L1 purificada. L2, que migra a aproximadamente 90 kDa, no es visible en los geles teñidos con Coomassie. Esto es de esperar, ya que L2 está presente en las VLP y los PsV del VPH en cantidades mucho más pequeñas que L1 (una relación máxima de L1:L2 se estima en 5:1). El análisis de transferencia Western con CamVir-1 muestra un claro aumento en la concentración y pureza de L1 en todas las muestras (Figura 12C y 12D).

Para confirmar adicionalmente la presencia de las VLP y los PsV de L1/L2, se examinaron muestras dializadas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 13). Todas las muestras mostraron la presencia de abundantes partículas, de tamaños que iban desde 30-120 nm. 54% de los mSEAP-PsV (Figura 13A y 13E) tenían 40-70 nm de diámetro, mientras que 47% de los mSEAP+ -PsV (Figura 13B y 13F) y 50% de los mluc+ -PsV (Figura 13C y 13G) 73% de las VLP de L1/L2 (Figura 13D y 13H) eran de un tamaño similar. Los viriones infecciosos del VPH suelen tener entre 50 y 60 nm de diámetro. Estas partículas mostraron una morfología similar a otros ejemplos de

partículas del VPH producidas por plantas (Maclean et al., 2007; Warzecha et al., 2003).

Para confirmar que el ADN del replicón estaba encapsulado para formar PsV, las fracciones agrupadas que contenían L1 se digirieron con proteinasa K para liberar el pseudogenoma encapsulado, seguido de PCR inversa con cebadores específicos del replicón como se describió anteriormente para confirmar la presencia de ADN del replicón (Figura 14). La amplificación por PCR confirmó que los PsV de mSEAP, mSEAP+ (Figura 14A) y mluc+ (Figura 14B) contenían el replicón de ADN esperado. No se amplificó ningún replicón de ADN en muestras no tratadas con proteinasa K, lo que indica que el ADN estaba encapsulado y no se encontró fuera de la capa del virión. Las fracciones 17 y 18 de cada muestra se combinaron y dializaron. La amplificación por PCR de estas fracciones, antes o después de la digestión con proteinasa K, así como la amplificación de las VLP de L1/L2 tratadas con proteinasa K, no produjo productos de amplificación.

Como medida preliminar de la cantidad de PsV en cada muestra, se leyó la concentración de ADN de las muestras tratadas con proteinasa K usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). La Tabla 1 muestra las lecturas de NanoDrop para los tres tipos de PsV. Como una primera estimación amplia a la concentración de partículas para cada tipo, se utilizó la concentración de ADN para calcular el número de pseudogenomas presentes por microlitro, utilizando la fórmula:

$$\text{No de moléculas} = \frac{\text{ADN total (ng)}}{660 \cdot \text{pb} \cdot N_A / 10^{-9}}$$

en la que ng es nanogramos de ADN en 1 µl, pb es el tamaño del pseudogenoma en pares de bases y N_A es la constante de Avogadro. Los resultados se pueden ver en la Tabla 1. La concentración de moléculas para los tres tipos de PsV fue de miles de millones de partículas por mililitro. Estos datos asumen que todo el ADN presente era ADN de pseudogenoma y que cada PsV empaquetaba exactamente una copia del pseudogenoma. Tomados en conjunto, estos resultados indican la producción exitosa *in planta* de los PsV que contienen un gen informador por primera vez.

Tabla 1: Concentración estimada de ADN y partículas de PsV purificados

	mSEAP	mSEAP+	mluc+
ADN (ng/µl)	8,56	14,33	14,95
PsV (pseudogenomas/µl)	$1,63 \times 10^9$	$2,04 \times 10^9$	$1,84 \times 10^9$

Purificación de PsV producidos por plantas

El método de purificación desarrollado para extraer VLP del VPH de Varsani et al., 2003 (con las modificaciones descritas anteriormente) demostró ser exitoso para la purificación de los PsV. Una preocupación fue el uso de N_2 líquido para la molienda preliminar del material vegetal. Si bien esta etapa no fue, en sí mismo, un problema, los ciclos de congelación y descongelación, así como la congelación del material vegetal para almacenamiento a largo plazo a -70°C , resultaron en la degradación de las partículas de PsV (datos no mostrados). Como tal, el protocolo se modificó ligeramente para reemplazar la molienda del material de la hoja congelada con picar finamente el material de la hoja en PBS con alto contenido de sal antes de pasar directamente a la etapa de homogeneización. Esta alteración disminuyó notablemente la degradación de los PsV: la amplificación por PCR del replicón antes de la purificación de los PsV mostró mucho más producto de amplificación en el material vegetal fresco en comparación con el congelado (datos no mostrados).

Las micrografías electrónicas demuestran claramente el ensamblaje y aislamiento exitosos de las VLP y los PsV de L1/L2 del VPH en plantas. Los PsV producidos demostraron una variabilidad inusual en tamaño, en comparación con otros métodos de producción de VLP y PsV (Buck et al., 2004; Maclean et al., 2007; Touze y Coursaget, 1998). El amplio intervalo de tamaños, de 30 nm a 120 nm de diámetro, puede deberse a la combinación de fracciones correspondientes a una densidad de CsCl de 1,30-1,33 g/ml. Los PsV de L1/L2 del VPH deben encontrarse a una densidad de 1,32-1,34 g/ml y, como tales, algunos PsV más pequeños y más grandes que el intervalo de tamaño esperado de 50-60 nm pueden haberse agrupado, lo que da como resultado la variabilidad que se muestra. Otros investigadores han visto resultados similares en plantas transgénicas y sugieren que las partículas de menor tamaño pueden ser intermedios de ensamblaje (Biemelt et al., 2003). También es posible que los tamaños diferenciales que se observan en este documento se deban a un proceso de ensamblaje que difiere sustancialmente del de los viriones del VPH en células de mamíferos.

En informes anteriores sobre la producción de PsV del VPH se ha utilizado el tratamiento con benzonasa junto con la PCR para demostrar que el ADN está encapsulado dentro de la capa del virión y no simplemente asociado con el virión (Rossi et al., 2000; Unckell et al., 1997). Los PsV producidos en este estudio no se degradaron por la etapa de desnaturalización por PCR a 95°C , como lo demuestra la ausencia de amplificación del ADN del pseudogenoma en muestras de PsV no digeridas con proteinasa K. Como tal, la capa de proteína necesitaba ser digerida antes de la amplificación del pseudogenoma por PCR para demostrar la presencia de ADN de pseudogenoma. El significado de esto es doble. En primer lugar, no se requirió el tratamiento con benzonasa para demostrar la encapsulación del

ADN y, posteriormente, no se utilizó. En segundo lugar, y posiblemente más importante, esto demuestra que estos PsV son notablemente estables, incluso en condiciones de desnaturalización leve. Esta es una observación importante. Las VLP son generalmente relativamente inestables y deben tratarse con cierto cuidado para evitar el colapso de la partícula (Mach et al., 2006). Si bien los PsV son generalmente más estables, la mayoría de los que se han producido en otros sistemas no son tan estables como se ha demostrado que son estos PsV producidos por plantas. En consecuencia, esto sugiere una ventaja importante sobre los sistemas tradicionales de producción de PsV.

Los datos presentados en el presente documento son la primera evidencia clara de una producción y purificación con éxito de VLP de L1/L2 producidas por plantas. Si bien este no era el objetivo principal del proyecto, la producción de VLP de L1/L2 fue útil, ya que permitió una comparación de VLP y PsV producidos en plantas. Las micrografías electrónicas muestran claramente partículas regulares de 40-70 nm de diámetro. El bajo número de VLP que se muestra en relación con el número de PsV es el resultado de menos material de partida: las VLP se purificaron a partir de aproximadamente el 25% (por peso de hoja fresca) del material vegetal crudo utilizado para la producción de PsV. Las transferencias Western observadas en (Figura 9C y 9D) muestran claramente la presencia tanto de L1 como de L2 en plantas coinfiltradas con pTRAc-L1 y pTRAc-L2. Los niveles de L2 variaron notablemente entre los diferentes experimentos de coinfiltración, incluidas las coinfiltraciones para la producción de PsV. Esto no es sorprendente, ya que se ha demostrado que la proporción de L1:L2 varía entre 5:1 y 30:1 en viriones del VPH y VLP de L1/L2. Esta primera evidencia de producción de VLP de L1/L2 en plantas es un nuevo hito alentador en la producción con base en plantas de vacunas de VLP contra el VPH.

Una primera estimación de la concentración final de los PsV arrojó cifras de miles de millones por microlitro. Esta estimación es intrínsecamente aproximada: se hacen varias suposiciones y los datos de partida, la concentración de ADN obtenida por espectrofotometría, está lejos de ser precisa. Estas suposiciones son 1) que todo el ADN presente era ADN del pseudogenoma encapsulado, y 2) que cada PsV empaquetaba exactamente una copia del pseudogenoma. Sin embargo, es seguro asumir que estas estimaciones no se alejarían en más de dos órdenes de magnitud. Varios otros investigadores han intentado cuantificar la concentración de PsV de varios sistemas, generalmente usando cuantificación de L1 por ELISA (Fleury et al., 2008), ELISA de L1 en combinación con PCR (Unckell et al., 1997) o estimando unidades transductoras a partir de datos del ensayo informador (Buck et al., 2004). Las mejoras futuras de este sistema requerirán una estimación precisa de la concentración de PsV, como la proporcionada por la cuantificación por ELISA.

No se determinaron el rendimiento total ni el factor de concentración. A partir de las micrografías electrónicas y las transferencias Western se desprende claramente que había una concentración marcada de partículas. La transferencia Western de varias etapas de purificación (Figura 12) muestra claramente un aumento en la señal de L1, lo que sugiere una duplicación aproximada de la concentración de la muestra cruda de la planta con respecto a los PsV dializados. Sin embargo, este no es de ninguna manera un ensayo cuantitativo y, como tal, no se pueden llegar a conclusiones firmes sobre esa base. El trabajo adicional para determinar la concentración de PsV es una próxima etapa importante en la evaluación de la eficiencia de la producción de PsV en la planta.

Este estudio demostró con éxito la viabilidad de producir PsV en plantas. Sin embargo, queda mucho trabajo por dilucidar por completo el método de producción y la eficiencia de producción de los PsV producidos por plantas para que sean una alternativa viable a los métodos actuales. Lo más importante es que la cuantificación de los PsV producidos es la siguiente etapa necesaria. Esto podría lograrse con relativa sencillez, mediante ELISA de L1, como demostraron Touze y Coursaget (1998). Otra etapa importante es la investigación de todas las especies de ADN incorporadas a los viriones, para evitar problemas de contaminación al usar estos PsV. Por último, una posibilidad interesante es un protocolo de purificación simplificado. La complejidad del protocolo actual fue necesaria por la inestabilidad de las VLP. Sin embargo, la estabilidad demostrada de estos PsV sugiere que un protocolo de extracción de virus mucho más "severo", como los que se utilizan para la extracción de virus de plantas (EP Rybicki, comunicación personal), podría tener el mismo éxito en la purificación de PsV en una fracción del tiempo y el coste.

Ejemplo 4

Neutralización de la infección por pseudovirión

Ensayo de neutralización de pseudovirión

Para determinar si los PsV producidas por plantas eran útiles para PBNA, se pseudoinfectaron células de mamífero con PsV producidos por plantas. Se tripsinizaron células HEK293TT y se resuspendieron en medio de neutralización (medio de crecimiento estándar, usando DMEM que carece de rojo fenol) a una densidad de $0,3 \times 10^6$ células/ml y se sembraron en placas a razón de 100 μ l/pozo en una placa de 96 pozos. Las células se cultivaron a 37 °C durante 3-4 horas. Se añadieron 60 μ l de cada PsV por pozo, por triplicado, y se cultivaron durante 72 horas. Para los PsV que contienen un replicón SEAP, se recogió medio de cultivo celular. Para los que contenían el replicón de luciferasa, se eliminó el medio, las células se lavaron una vez con PBS y se añadió un volumen apropiado de tampón de lisis de cultivo celular (Promega, 20 μ l para placas de 96 pozos, 400 μ l para placas de 6 pozos) a las células. Las células se agitaron en un agitador orbital durante 15 minutos y se almacenaron a -20 °C durante la noche.

Para medir la producción de luciferasa en células de mamíferos, se utilizó el kit del sistema de ensayo de luciferasa

(Promega), de acuerdo con las instrucciones del kit. Se añadieron 100 µl de sustrato de luciferasa luciferina a 20 µl de lisado celular. La luminiscencia se leyó en un lector de microplacas Modulus (Turner BioSystems).

Se utilizó transferencia Western para confirmar la expresión de SEAP después de la transfección. Se usaron 32 µl de medio de cultivo celular de células transfectadas con el casete de SEAP para SDS-PAGE, como se describió anteriormente. Las transferencias se sondearon con un anticuerpo primario policlonal anti-fosfatasa alcalina intestinal de ternera (anticuAP) producido por ovejas (Abcam, ab7330) y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina anti-oveja de ratón (Sigma, A8062). La actividad de SEAP se ensayó usando el kit de quimioluminiscencia de SEAP Great EscAPe (Clontech Laboratories, Inc.), a razón de 0,6 volúmenes de los descritos en las instrucciones del kit. Brevemente, se recogieron 50 µl de medio de cultivo celular a las 72 horas después de la transfección. Se añadieron 15 µl a 45 µl de tampón de dilución y se incubaron a 65 °C durante 30 minutos. Las muestras se colocaron en hielo durante 5 minutos, antes de agregar 60 µl de solución de sustrato de SEAP, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Se detectó luminiscencia en un lector de microplacas Modulus (Turner BioSystems) durante 10 segundos. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calculó la desviación estándar para todas las muestras.

Para confirmar que los PsV producidos por plantas se podían usar para el PBNA, se ensayó la neutralización de los PsV usando un anticuerpo neutralizante del VPH-16 conocido, siguiendo el protocolo descrito por Buck et al., (2005a). Las células HEK293TT se prepararon como describen Pastrana et al., (2004). Se incubaron 60 µl de PsV con 15 µl de anticuerpo neutralizante VPH-16.V5 (desarrollado por Christensen et al., (1996)) a una dilución de 1 en 4000 (para una dilución final 1 en 20000) en hielo durante 60 minutos. Se añadieron gota a gota 75 µl de PsV a las células por triplicado y las células se incubaron durante 72 horas. Se ensayaron la actividad de luciferasa y SEAP como se describió previamente. Se calculó la desviación estándar para todas las muestras.

Ensayo de neutralización con base en pseudovirión utilizando PsV producidos por plantas

Para demostrar que los PsV del VPH-16 producidos en plantas son una herramienta biológica eficaz para su uso en el PBNA, se probaron los PsV para determinar la expresión del informador en células de mamíferos, así como para la neutralización con un anticuerpo neutralizante del VPH-16 de uso común, VPH-16.V5. Se cultivaron células HEK293TT en placas de 96 pozos y se pseudoinfectaron con 60 µl de PsV purificados y sin diluir en NaCl 0,5 M en PBS, con o sin incubación previa con anticuerpos monoclonales VPH-16.V5 diluidos 1:20000 en medio de neutralización. La infección exitosa de células de mamíferos con PsV, así como la neutralización de PsV, se demostró mediante la expresión del gen informador luc o SEAP en estas células. La Figura 15 muestra la expresión del gen informador para las células 72 horas después de la infección con PsV, mSEAP (Figura 15A), mSEAP+ (Figura 15B) y mluc+ (3.12C) con o sin la presencia de anticuerpos neutralizantes (PsV o PsV + NAb, respectivamente). El control negativo (-ve) de cada experimento (células de mamífero con 60 µl de medio de neutralización añadido) proporciona una lectura de referencia en RLU, mientras que la transfección con el ADN plasmídico libre de endotoxina correspondiente se utiliza para el control positivo. La pseudoinfección con PsV mSEAP provocó una clara respuesta positiva de SEAP (Figura 15A), aunque no tan fuerte como la de las células transfectadas con ADN plasmídico por lipofección. La incubación con anticuerpo neutralizante neutralizó parcialmente la infección, como lo demuestra una disminución en la señal de SEAP. La pseudoinfección con PsV mSEAP+ no mostró una señal de SEAP fuerte por encima del nivel de línea base proporcionado por el control negativo (Figura 15B). Como tal, no se observó neutralización de PsV mSEAP+. La pseudoinfección con PsV mluc+ provocó una señal de luciferasa débil, aunque claramente por encima de la del control negativo. La incubación con NAb VPH-16.V5 neutralizó completamente la expresión de luciferasa, dando como resultado una expresión idéntica a la del control negativo.

Prueba de PsV y PBNA en células de mamíferos

Para que los PsV producidos por plantas sean una herramienta útil para la prueba de vacunas, es vital demostrar su uso en el ensayo de neutralización con base en pseudoviriones. Los PsV se analizaron para determinar la expresión del gen informador del pseudogenoma y la actividad de PBNA usando el kit de quimioluminiscencia de SEAP Great EscAPe (Clontech Laboratories, Inc.) o el sistema de ensayo de luciferasa (Sigma). El kit Great EscAPe se utiliza para el protocolo de PBNA ampliamente aceptado desarrollado por los laboratorios Schiller, por su sensibilidad y facilidad de uso (Buck et al., 2005a). La luciferasa ha mostrado una amplia utilidad como un ensayo informador fácil y sensible, y se eligió debido a su sistema Great EscAPe de bajo coste, así como para probar un tamaño de pseudogenoma alternativo y un sistema informador.

De los tres tipos de PsV producidos, dos (PsV mSEAP y PsV mluc+) mostraron actividad informadora de bajo nivel después de la pseudoinfección de células de mamíferos, mientras que un (mSEAP+) mostró poca o ninguna actividad informadora. Un ensayo de neutralización preliminar usando un anticuerpo neutralizante de VPH-16 monoclonal de ratón bien establecido VPH-16.V5 (Christensen et al., 1996), demostró la neutralización parcial de la infección por PsV mSEAP y la neutralización completa de la infección por PsV mluc+. No está claro por qué los PsV mSEAP+ no logró inducir la expresión del gen informador en células de mamíferos. El casete de SEAP es claramente funcional, como lo demuestra la expresión exitosa del gen informador por PsV mSEAP. Es poco probable que el casete de la planta incorporado en el pseudogenoma sea la causa; PsV mluc+ también incorporaron un casete de expresión de la planta idéntico sin afectar la expresión. Es posible que se deba a la baja concentración de partículas en comparación con los

otros dos tipos de PsV; mientras que las estimaciones de concentración basadas en la presencia de ADN no revelaron diferencias importantes, las micrografías electrónicas mostraron menos partículas en las muestras de PsV mSEAP+ en comparación con las otros dos tipos de PsV. Si bien son preliminares, estos datos proporcionan una prueba de concepto inicial para la producción de PsV *in planta* para su uso en el PBNA.

La expresión del gen informador después de la pseudoinfección fue considerablemente más baja de lo esperado. La mayoría de los estudios de PBNA anteriores han necesitado diluir PsV hasta 1000000 de veces para estar dentro del intervalo lineal del ensayo de SEAP. Los cálculos preliminares determinaron que la concentración de partículas de PsV era similar a la obtenida por Buck et al., (2005a). En consecuencia, se esperaba que la infectividad fuera similar. Sin embargo, este no fue el caso: los PsV probados en el presente documento mostraron una expresión del gen informador limitada, a pesar de que se agregaron sin diluir a las células. La expresión por pseudoinfección fue menor que la del ADN transfectado por lipofección. El ADN total agregado por transfección de FuGene a cada pozo de una placa de 96 pozos fue de aproximadamente 200 ng por pozo, mientras que el ADN total en una muestra de PsV de 60 µl, de acuerdo con lo determinado por espectrofotometría NanoDrop, fue de 500-900 ng, dependiendo de la muestra. Trabajos anteriores han demostrado que la infectividad de los PsV puede ser bastante baja; Roden et al., (1996) estimaron una infectividad de 1 en 10000 células, mientras que Unckell et al., (1997) y Touze y Coursaget (1998) estimaron proporciones de 1:2000, 1:1000, respectivamente. Sin embargo, esto no explica completamente la mala expresión que sigue a la pseudoinfección. Es probable que la causa de esta discrepancia sea el tampón en el que se dializaron los PsV después de la purificación, a saber, NaCl 0,5 M en PBS. Los cambios en la osmolalidad de los medios de cultivo celular (una medida de la concentración de partículas en solución) tienen un efecto marcado en las células de mamíferos. La osmolalidad fisiológica se estima en 290-320 mOsm/kg para tejidos de mamíferos (Waymouth, 1970). Es probable que cualquier desviación importante de esto, como la introducción de grandes cantidades de NaCl en los medios de cultivo celular, afecte seriamente el crecimiento de las células, así como su capacidad para producir proteínas recombinantes. Es probable que este sea el caso en el presente documento, y una prioridad para el trabajo futuro es repetir estos experimentos con PsV en un tampón con menos sal. Se eligió este tampón porque se ha demostrado que ayuda a la estabilidad de las VLP producidas en las plantas (Varsani et al., 2003). Sin embargo, estos PsV han demostrado una marcada estabilidad a las condiciones de desnaturalización y es probable que sean estables en PBS.

Ejemplo 5

Mejora del plásmido informador y PBNA utilizando el plásmido mejorado

Introducción del origen de replicación del SV40

Para evaluar si se podía mejorar la expresión del gen informador, se clonó el origen de replicación de SV40 (SV40ori) en los vectores pRIC3-mSEAP, pRIC3-mSEAP+ y pRIC3-mluc (Figura 19). Los inventores plantearon la hipótesis de que la inclusión de SV40ori en el plásmido aumentaría la amplificación de SEAP en células HEK293TT y mejoraría los rendimientos de la proteína informadora. Los vectores que contenían SV40ori (pRIC3-mSEAP-SV40ori (SEQ ID NO: 15), pRIC3-mSEAP+ -SV40ori (SEQ ID NO: 16) y pRIC3-mLuc+ -SV40ori (SEQ ID NO: 17)) se probaron en cultivo de tejido añadiendo el ADN a las células HEK293TT y comparando los niveles de expresión con los obtenidos con los vectores de ADN originales.

Producción de PsV mSEAP-SV40ori

Se infiltraron pRIC3-mSEAP-SV40ori, pTRAc-hL1 y pTRAc-hL2 en plantas como se describió anteriormente. Se produjeron PsV que contenían un vector de replicación que codifica un polipéptido para SEAP utilizando constructos mSEAP+ y mSEAP+ -SV40ori. Los extractos crudos de plantas se agregaron directamente a gradientes Optiprep continuos (vertidos el día anterior) o discontinuos (recién vertidos) (20%, 33%, 40%, 50%). Los gradientes se centrifugaron durante 6 horas a 32000 rpm. Las fracciones que produjeron las transferencias más oscuras en una transferencia de puntos de los gradientes discontinuos tanto para mSEAP+ como para mSEAP+ -SV40ori se combinaron y se usaron para pseudoinfectar células HEK293TT. Los PsV se diluyeron en medio DMEM, se añadieron 5 x 10⁵ células a placas de 6 pozos, se incubaron a 37 °C durante 3 horas y se vertieron 400 µl de los PsV (diluidos 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 en DMEM) en las células. Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 días. La actividad de SEAP se evaluó en las células HEK293TT evaluando la actividad de la fosfatasa alcalina usando transferencias de puntos. Los inventores pudieron detectar AP en el sobrenadante de células infectadas con mSEAP+ y mSEAP+ -SV40+ori. A continuación, se utilizó un kit de SEAP para determinar la cantidad de SEAP en el sobrenadante (Tabla 2, Figura 20). No se detectó un aumento significativo de la actividad en los PsV mSEAP+ -SV40ori.

Tabla 2: Determinación de los niveles de SEAP en unidades de luz relativas (RLU) por dilución de PsV producidos por la planta agregados a las células HEK293TT. El control negativo es sin ADN y el control positivo es solo mSEAP+ADN.

mSEAP+		mSEAP+-SV40ori	
Dilución de PsV	RLU	Dilución de PsV	RLU
1	970.000	1	1.140.000
10	1.080.000	10	12.300
100	9.200	100	9.080
1000	8.500	1000	4.660
Neg	3.380		
ADN 1 µg	33.900.000		

Referencias

- Bakker et al., 2006. Proc Natl Acad Sci USA 103, 7577-7582.
- 5 Biemelt et al., 2003. Journal of virology 77, 9211-9220.
- Bird et al., 2008. Journal of virology 82, 9848-9857.
- Bousarghin et al., 2002. Journal of clinical microbiology 40, 926-932.
- Brondyk., 2009. Methods in enzymology 463, 131-147.
- Buck et al., 2008. Journal of virology 82, 5190-5197.
- 10 Buck et al., 2004. Journal of virology 78, 751-757.
- Buck et al., 2005a. Methods in molecular medicine 119, 445-462.
- Buck et al., 2005b. Journal of virology 79, 2839-2846.
- Christensen et al., 1996. Virology 223, 174-184 Christensen et al., 1990. Journal of virology 64, 5678-5681.
- Christensen et al., 1992. The Journal of general virology 73 (Pt 5), 1261-1267.
- 15 Chromy et al., 2006. Journal of virology 80, 5086-5091.
- Daniell et al., 2009. Trends in plant science 14, 669-679.
- Dessy et al., 2008. Human vaccines 4, 425-434.
- Durrani et al., 1998. Journal of immunological methods 220, 93-103.
- Dvoretzky et al., 1980. Virology 103, 369-375.
- 20 Fay et al., 2004. Journal of virology 78, 13447-13454.
- Ferlay et al., 2010. International journal of cancer. 127, 2893-2917.
- Fleury et al., 2008. Clinical and vaccine immunology : CVI 15, 172-175.
- Garcea and Gissmann., 2004. Current opinion in biotechnology 15, 513-517.
- Giorgi et al., 2010. Expert.Rev.Vaccines. 9, 913-924.
- 25 Gleba et al., 2007. Current opinion in biotechnology 18, 134-141.
- Harper et al., 2006. Lancet 367, 1247-1255.
- Holmgren et al., 2005. Journal of virology 79, 3938-3948.
- Huang et al., 2009. Biotechnology and bioengineering 103, 706-714.
- Kapila et al., 1997. Plant Science 122, 101-108.
- 30 Kawana et al., 1998. Journal of virology 72, 10298-10300.
- Kellogg., 1927. International Critical Tables. Science 65, 273.
- Kohl et al., 2006. Clinical and vaccine immunology : CVI 13, 845-853.
- Kreider et al., 1987. Journal of virology 61, 590-593.
- Kunik et al., 1999. Journal of experimental botany 50, 731-732.
- 35 Li et al., 1997. Journal of virology 71, 2988-2995.
- Ma et al., 2011. Therapeutic delivery 2, 427-430.
- Ma et al., 2005. Trends in plant science 10, 580-585.
- Mach et al., 2006. Journal of pharmaceutical sciences 95, 2195-2206.
- Maclean et al., 2007. The Journal of general virology 88, 1460-1469.
- 40 Matic et al., 2012. Plant biotechnology journal.
- Muller et al., 1995. Journal of virology 69, 948-954.
- Nuttall et al., 2002. European journal of biochemistry/FEBS 269, 6042-6051.
- Ochsenbauer y Kappes., 2009. Current opinion in HIV and AIDS 4, 418-425.
- Ogle., 2008. Universidad de Ciudad del Cabo, Ciudad del Cabo.
- 45 Oh et al., 2004. Virology 328, 266-273.
- Okun et al., 2001. Journal of virology 75, 4332-4342.
- Pastrana et al., 2004. Virology 321, 205-216.
- Peng et al., 2011. Cell & bioscience 1, 26.
- Pereira., 2008. Universidad de Ciudad del Cabo, Ciudad del Cabo.
- 50 Pereira et al., 2009. Arch Virol 154, 187-197.
- Regnard et al., 2010. Plant biotechnology journal 8, 38-46.
- Robbins et al., 1995. The Journal of infectious diseases 171, 1387-1398.
- Roden et al., 1996. Journal of virology 70, 5875-5883.
- Rossi et al., 2000. Human gene therapy 11, 1165-1176.
- 55 Rybicki., 2010. Plant biotechnology journal 8, 620-637.
- Santi et al., 2006. Methods 40, 66-76.
- Schillberg et al., 2005. Vaccine 23, 1764-1769.

Shen and Forde 1989. Nucleic acids research 17, 8385.
 Shi et al., 2001. Journal of virology 75, 10139-10148.
 Smith et al., 1995. The Journal of investigative dermatology 105, 438-444.
 Stanley et al., 2008. Vaccine 26 Supl. 10, K62-67.
 5 Stauffer et al., 1998. Journal of molecular biology 283, 529-536.
 Sullivan y Pipas, 2001. Virology 287, 1-8.
 Tiwari et al., 2009. Biotechnology advances 27, 449-467.
 Touze y Coursaget., 1998. Nucleic acids research 26, 1317-1323.
 Turpen et al., 1995. Biotechnology (N Y) 13, 53-57.
 10 Unckell et al., 1997. Journal of virology 71, 2934-2939.
 Varsani et al., 2003. Journal of virology 77, 8386-8393.
 Varsani et al., 2006. Virus research 120, 91-96.
 Warzecha et al, 2003. Journal of virology 77, 8702-8711.
 Waymouth, 1970. In vitro 6, 109-127.
 15 Yeager et al., 2000. Virology 278, 570-577.
 Zhang y Mason. 2006. Biotechnol. Bioeng. 93, 271-279.
 Zhou et al., 1993. Virology 194, 210-218.
 Zupan et al., 2000. The plant journal: for cell and molecular biology 23, 11-28.

20 Listado de secuencias

<110> Universidad de Ciudad del Cabo

<120> Pseudovirión del virus del papiloma humano producido por plantas

25 <130> PA158146/PCT

<150> ZA 2013/05650

30 <151> 2013-07-25

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido - lucQ-F

45 <400> 1
 caactgcata aggctatgaa gaga 24

<210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido - lucQ-R

55 <400> 2
 atttgtattc agcccatatc gttt 24

<210> 3
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido - SEAPQ-F

<400> 3
 ccttgacccc gcacaggta 19
 5 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido - SEAPQ-R
 <400> 4
 ggctctgtcc aagacatata atgta 25
 15 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido - poliA35SS-F
 <400> 5
 25 aggggtctta tagggtttcg ctc 23
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido - CMV-R
 35 <400> 6
 ccctgtaacg tatgtgaga 19
 <210> 7
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido - Rep-F
 45 <400> 7
 tccatcgtgc gtcagatttg cg 22
 <210> 8
 50 <211> 3073
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> casete de mSEAP
 <400> 8

ES 2 842 211 T3

gtcgacggat ccttatcgat tttaccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc	60
tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttggt gttaacttgt	120
ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat cacaaatttc aaaaataaag	180
catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg	240
tctgctcgaa gcggccggcc gcccgaactc tagagtaacc cgggtgcgcg gcgtcggtagg	300
tgccggcggg gggcgccagg tcgcaggcgg tgtagggctc caggcaggcg gcgaaggcca	360
tgacgtgcgc tatgaaggtc tgctcctgca cgccgtgaac cagggtgcgc tgccggccgc	420
gcgcgaacac cgccacgtcc tcgcctgcgt gggctctctc gtccaggggc actgctgact	480
gctgccgata ctcggggctc ccgctctcgc tctcggtaac atccggccgg gcgccgtcct	540

tgagcacata	gcctggaccg	tttccgtata	ggaggaccgt	gtaggccttc	ctgtcccggg	600
ccttgccagg	ggccagcccg	aagatggagc	tccctcgag	ggggtagcct	ccgaaggaga	660
agacgtggga	gtggtcggca	gtgacgaggc	tcagcgtgtc	ctcctcgctg	gtgagctggc	720
ccgccctctc	aatggcgctc	tcgaacatga	tcgtctcagt	cagtgcccg	taagccctgc	780
tttcatgatg	accatggtcg	atgcgaccac	cctccacgaa	gaggaagaag	ccgcgggggt	840
tcctgctcag	caggcgcagg	gcagcctctg	tcattctccat	caggaggggg	tccagtgtgg	900
agtctcggtg	gatctcgat	ttcatgtctc	caggctcaaa	gagacccatg	agatgggtca	960
cagacgggtc	caggaagcc	tgcattgagc	cagtgcggtt	ccacacatac	cgggcaccct	1020
ggcgcttcgc	cagccattcc	tgcaccagat	tcttcccgtc	cagcctgggtc	ccaccttggc	1080
tgtagtcatc	tgggtactca	gggtctgggg	ttcccatg	aaacatgtac	tttcggcctc	1140
cacctaggat	cacgtcaatg	tccatgttgg	agatgagctg	cgtagcgatg	tcctggcacc	1200
cctcctggcg	ggccgaggca	ggcacgtcgg	cgtccgagta	ccagttgcgg	ttcaccgtgt	1260
gggcgttaggt	gccggctggc	gaggcgtgct	gcactcgtgt	ggtggttacc	actcccactg	1320
acttccctgc	tttcttggcc	cgattcatca	cggagatgac	ctcgttgcgg	cgtgtcgtgt	1380
tgcactgggt	aaagcggcg	gctgcactca	agccaatggt	ctggaagtgt	cccttgaccc	1440
cgcacaggta	ggccgtggct	gtggctccac	tgtctggcac	atgtttgtct	acattgtatg	1500
tcttggacag	agccacatat	gggaagcgg	ccatggccag	gggtatctca	ggccccagtt	1560
tgtccttctt	ctgccctttt	aggatcctgg	cagctgtcac	cgtagacacc	cccatcccat	1620
cgcacaggaa	gatgatgagg	ttcttggcgg	ctgtctgtgc	aggctgcagc	ttcttggcgg	1680
cacccagggc	ctcggtgcc	tcgcggttcc	agaagtccgg	gttctcctcc	tcaactggga	1740
tgatgccag	ggagagctgt	agcctcaggc	ccagcagcag	cagcagcagc	agcatggtgg	1800
gcgaattcgc	gattcgaagc	ttacttagat	cgcagatcca	gcacaatgga	tctcgaggtc	1860
gagggatctc	tacagaattc	tcacgacacc	tgaatggaa	gaaaaaaact	ttgaaccact	1920
gtctgaggct	tgagaatgaa	ccaagatcca	aactcaaaaa	gggcaaattc	caaggagaat	1980
tacatcaagt	gccaagctgg	cctaacttca	gtctccaccc	actcagtgtg	gggaaactcc	2040
atcgcataaa	acccctcccc	ccaacctaaa	gacgacgtac	tccaaaagct	cgagaactaa	2100
tcgaggtgcc	tggacggcgc	ccggtactcc	gtggagtcac	atgaagcgac	ggctgaggac	2160
ggaaaggccc	ttttcctttg	tgtgggtgac	tcacccgccc	gctctcccga	gcgcgcgctc	2220
ctccattttg	agctccctgc	agcaggggcc	ggaagcggcc	atctttccgc	tcacgcaact	2280
ggtgccgacc	gggccagcct	tgccgcccag	ggcggggcga	tacacggcgg	cgcgaggcca	2340
ggcaccagag	caggccggcc	agcttgagac	taccccccgtc	cgattctcgg	tggccgcgct	2400
cgcaggcccc	gcctcgccga	acatgtgcgc	tgggacgcac	gggccccgtc	gccgcccgcg	2460

gccccaaaaa ccgaaatacc agtgtgcaga tcttgccccg catttacaag actatcttgc 2520
 cagaaaaaaa gcgtcgcagc aggtcatcaa aaatttttaa tggctagaga cttatcgaaa 2580
 gcagcgagac aggcgcgaag gtgccaccag attcgcacgc ggccggcccca gcgccaggc 2640
 caggcctcaa ctcaagcacg aggcgaaggg gctccttaag cgcaaggcct cgaactctcc 2700
 caccacttcc caacccgaag ctccgggatca agaatacagt actgcagcca ggtggaagta 2760
 attcaaggca cgcaagggcc ataaccctga aagaggccag gcccgccgga accacacacg 2820
 gcacttacct gtgttctggc ggcaaaccct ttgcgaaaaa gaacgttcac ggcgactact 2880
 gcacttatat acggttctcc cccaccctcg ggaaaaaggc ggagccagta cagcacatca 2940
 ctttcccagt ttaccccgcg ccaccttctc taggcaccgg ttcaattgcc gaccctccc 3000
 cccaacttct cggggactgt gggcgatgtg cgctctgccc actgacgggc accggagcca 3060
 attcccagtc gac 3073

<210> 9
 <211> 4845
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> casete de mSEAP+

<400> 9

gtcgacggat ccttatcgat tttaccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc 60
 tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttggt gttaacttgt 120
 ttattgcagc ttataatggg tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag 180
 catttttttc actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg 240
 tctgctcgaa gcggccggcc gccccgactc tagagtaacc cgggtgcgcg gcgtcgggtg 300
 tgccggcggg gggcgccagg tcgcaggcgg tgtagggctc caggcaggcg gcgaaggcca 360
 tgacgtgcgc tatgaaggct tgctcctgca cgccgtgaac cagggtgcgc tgccggccgc 420
 gcgcgaacac cgccacgtcc tcgcctgcgt gggctctctc gtccaggggc actgctgact 480
 gctgccgata ctccggggct ccgctctcgc tctcggtaac atccggccgg gcgcctcct 540
 tgagcacata gcctggaccg tttccgtata ggaggaccgt gtaggccttc ctgtcccggg 600
 ccttgccagg gccagcccg aagatggagc tccctcgcag ggggtagcct ccgaaggaga 660
 agacgtggga gtggtcggca gtgacgaggc tcagcgtgtc ctctcgtctg gtgagctggc 720
 ccgccctctc aatggcgtcg tcgaacatga tcgtctcagt cagtccccgg taagccctgc 780
 tttcatgatg accatggtcg atgcgaccac cctccacgaa gaggaagaag ccgcgggggt 840
 tcctgctcag caggcgcagg gcagcctctg tcatctccat caggggagggg tccagtgtgg 900

ES 2 842 211 T3

agtctcgggtg gatctcgtat ttcattgtctc cagggtcaaa gagacccatg agatgggtca	960
cagacgggtc caggaagcc tgcattgagct cagtgcggtt ccacacatac cgggcaccct	1020
ggcgcttcgc cagccattcc tgcaccagat tcttcccgtc cagcctgggtc ccaccttggc	1080
tgtagtcatc tgggtactca ggggtctgggg tttccatgcg aaacatgtac tttcggcctc	1140
cacctaggat cacgtcaatg tccattgttg agatgagctg cgtagcgatg tccctggcacc	1200
cctcctggcg ggccgaggca ggcacgtcgg cgtccgagta ccagttgcgg ttcaccgtgt	1260
gggcgtaggt gccggtggc gaggcgtgct gcaactcgtgt ggtggttacc actccactg	1320
acttccctgc tttcttggcc cgattcatca cggagatgac ctggttgccg cgtgtcgtgt	1380
tgcactggtt aaagcgggcg gctgcactca agccaatggt ctggaagttg cccttgacct	1440
cgcacaggta ggccgtggct gtggctccac tgtctggcac atgtttgtct acattgtatg	1500
tcttggacag agccacatat gggaagcggc ccatggccag gggatatctca ggccccagtt	1560
tgtccttctt ctgccctttt aggatcctgg cagctgtcac cgtagacacc cccatcccat	1620
cgccaggaa gatgatgagg ttcttggcgg ctgtctgtgc aggctgcagc ttcttggcgg	1680
caccagggc ctcggtgcc tcgcggttcc agaagtccgg gttctcctcc tcaactggga	1740
tgatgccag ggagagctgt agcctcaggc ccagcagcag cagcagcagc agcatggtgg	1800
gcgaattcgc gattcgaagc ttacttagat cgcagatcca gcacaatgga tctcgaggtc	1860
gagggatctc tacagaattc tcacgacacc tgaaatggaa gaaaaaaact ttgaaccact	1920
gtctgaggct tgagaatgaa ccaagatcca aactcaaaaa gggcaaattc caaggagaat	1980
tacatcaagt gccaaagctgg cctaacttca gtctccaccc actcagtgtg gggaaactcc	2040
atcgcataaa acccctcccc ccaacctaaa gacgacgtac tccaaaagct cgagaactaa	2100
tcgaggtgcc tggacggcgc ccggtactcc gtggagtcac atgaagcgac ggctgaggac	2160
ggaaaggccc ttttcctttg tgtgggtgac tcaccgccc gctctcccga gcgcgcgctc	2220
ctccattttg agctccctgc agcaggggccg ggaagcggcc atctttccgc tcacgcaact	2280
ggtgccgacc gggccagcct tgccgcccag ggcggggcga tacacggcgg cgcgaggcca	2340
ggcaccagag caggccggcc agcttgagac taccctcgtc cgattctcgg tggccgcgct	2400
cgcaggcccc gcctcgccga acatgtgcgc tgggacgcac gggccccgtc gccgcccgcg	2460
gccccaaaaa ccgaaatacc agtgtgcaga tcttggcccc catttacaag actatcttgc	2520
cagaaaaaaa gcgtcgcagc aggtcatcaa aaatttttaa tggctagaga cttatcgaaa	2580
gcagcgagac aggcgcgaag gtgccaccag attcgcacgc ggcggcccca gcgcccaggc	2640
caggcctcaa ctcaagcacg aggcgaaggg gtccttaag cgcaaggcct cgaactctcc	2700
caccacttc caaccgaag ctcgggatca agaatacgt actgcagcca ggtggaagta	2760
attcaaggca cgcaagggcc ataaccgta aagaggccag gcccgcgga accacacacg	2820

gcacttacct gtgttctggc ggcaaaccgc ttgcgaaaaa gaacgttcac ggcgactact	2880
gcacttatat acggttctcc cccaccctcg ggaaaaaggc ggagccagta cagcacatca	2940
ctttcccagt ttaccccgcg ccaccttctc taggcaccgg ttcaattgcc gaccctccc	3000
cccaacttct cggggactgt gggcgatgtg cgctctgcc actgacgggc accggagcca	3060
attcccagtc gacctggtcc aaagaccaga gggctattga gacttttcaa caaagggtaa	3120
tatcgggaaa cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcata gaaaggacag	3180
tagaaaagga agatggcttc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gctatcgttc	3240
aagatgcctc taccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg aacatcgtgg	3300
aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat acatggtgga	3360
gcacgacact ctcgcttact ccaagaatat caaagataga gtctcagaag accagagggc	3420
tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc ctcggtatcc attgcccagc	3480
tatctgtcac ttcatcgaaa ggacagtaga aaaggaagat ggcttctaca aatgccatca	3540
ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctacc gacagtggtc ccaaagatgg	3600
acccccaccc acgaggaaca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca	3660
agtggattga tgtgatatct ccactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc	3720
gcaagaccct tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggacac gctgagttca	3780
caacacaaat cagatttata gagagattta taaaaaaaaa aaaacatgtg atcccgggaa	3840
ttcgctagca ctagaggatc cccgggtacc ggtcgccacc ctagagtcgc ggccgcttta	3900
cttgtacagc tcgtccatgc cgagagtgat cccggcgggc gtccacgaact ccagcaggac	3960
catgtgatcg cgcttctcgt tggggctctt gctcagggcg gactgggtgc tcaggtagtg	4020
gttgtcgggc agcagcacgg gcccgctcgcc gatgggggtg ttctgctggt agtggtcggc	4080
gagctgcacg ctgccgtcct cgatgttgtg gcggatcttg aagttcacct tgatgccgtt	4140
cttctgcttg tcggccatga tatagacgtt gtggctgttg tagttgtact ccagcttgtg	4200
ccccaggatg ttgccgtcct ccttgaagtc gatgcccttc agctcgatgc ggttcaccag	4260
ggtgtcgccc tcgaacttca cctcggcgcg ggtcttgtag ttgccgtcgt ccttgaagaa	4320
gatggtgcgc tcctggacgt agccttcggg catggcggac ttgaagaagt cgtgctgctt	4380
catgtggctg gggtagcggc tgaagcactg cacgccgtag gtcaggggtg tcacgaggg	4440
gggccagggc acgggcagct tgccggtggt gcagatgaac ttcagggta gcttgccgta	4500
ggtggcatcg ccctcgccct cgccggacac gctgaacttg tggccgttta cgtcgccgtc	4560
cagctcgacc aggatgggca ccaccccggt gaacagctcc tcgcccttgc tcaccatagt	4620
ccgcaaaaat caccagtctc tctctacaaa tctatctctc tctatttttc tccagaataa	4680

ES 2 842 211 T3

tgtgtgagta gttcccagat aagggaatta gggttcttat agggtttcgc tcatgtgttg	4740
agcatataag aaacccttag tatgtatttg tatttgtaaa atacttctat caataaaatt	4800
tctaattcct aaaacccaaa tccagtgacc gggcggcggc tcgag	4845

<210> 10
 <211> 5866
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> casete de mluc+

<400> 10

gtcgacgata tcgccatddd tccaaaagtg attdttgggc atacgcgata tctggcgata	60
gcgcttatat cgtttacggg ggatggcgat agacgacttt ggtgacttgg gcgattctgt	120
gtgtcgcaaa tatcgagtt tcgatatagg tgacagacga tatgaggcta tatcgccgat	180
agaggcgaca tcaagctggc acatggccaa tgcatatcga tctatacatt gaatcaatat	240
tggccattag ccatattatt cattggttat atagcataaa tcaatattgg ctattggcca	300
ttgcatacgt tgtatccata tcataatatg tacatttata ttggctcatg tccaacatta	360
ccgccatgtt gacattgatt attgactagt aggtgtcgct aggtcagca aaattacggg	420
cccactggct cttcccacaa ccgggcgggc ccactatgac gtgtacagct gtcttccaat	480
cacgctgctg catcttcccg ctcactttca aaagttcagc cagcccgcgg aaatttctca	540
catacgttac agggaaactgc tccatatgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc	600
attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc	660
tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt	720
aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcca	780
cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg	840
taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca	900
gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa	960
tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa	1020
tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc	1080
ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg	1140
tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag	1200
acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc ggattccccg	1260
tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccaccccct tggcttctta	1320
tgcatgctat actgtttttg gcttggggtc tatacacccc cgcttcctca tgttataggt	1380
gatgggtatag cttagcctat aggtgtgggt tattgaccat tattgaccac tcccctattg	1440

gtgacgatac tttccattac taatccataa catggctctt tgccacaact ctctttattg	1500
gctatatgcc aatacactgt ccttcagaga ctgacacgga ctctgtatatt ttacaggatg	1560
gggtctcatt tattattttac aaattcacat atacaacacc accgtcccca gtgcccgcag	1620
tttttattaa acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt ccggacatgg	1680
gctcttctcc ggtagcggcg gagcttctac atccgagccc tgctcccatg cctccagcga	1740
ctcatggctcg ctccggcagct ccttgctcct aacagtggag gccagactta ggcacagcac	1800
gatgccacc accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtagggtatg tgtctgaaaa	1860
tgagctcggg gagcgggctt gcaccgctga cgcatttgga agacttaagg cagcggcaga	1920
agaagatgca ggcagctgag ttgttggtt ctgataagag tcagaggtaa ctcccgttgc	1980
ggtgctgtta acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcgttgctg ccgcgcgcgc	2040
caccagacat aatagctgac agactaacag actgttcctt tccatgggtc ttttctgcag	2100
tcaccgtcct tgacacgaag cttatggaag acgccaaaaa cataaagaaa ggccccggcg	2160
cattctatcc gctggaagat ggaaccgctg gagagcaact gcataaggct atgaagagat	2220
acgccctggt tcctggaaca attgctttta cagatgcaca tatcgaggtg gacatcactt	2280
acgctgagta cttcgaaatg tccgttcggt tggcagaagc tatgaaacga tatgggctga	2340
atacaaatca cagaatcgtc gtatgcagtg aaaactctct tcaattcttt atgccggtgt	2400
tgggcgcggt atttatcggg gttgcagttg cggccgcgaa cgacatttat aatgaacgtg	2460
aattgctcaa cagtatgggc atttcgcagc ctaccgtggt gttcgtttcc aaaaaggggt	2520
tgcaaaaaat tttgaacgtg caaaaaaagc tcccaatcat ccaaaaaatt attatcatgg	2580
attctaaaac ggattaccag ggatttcagt cgatgtacac gttcgtcaca tctcatctac	2640
ctcccgggtt taatgaatac gattttgtgc cagagtcctt cgatagggaac aagacaattg	2700
cactgatcat gaactcctct ggatctactg gtctgcctaa aggtgtcgct ctgcctcata	2760
gaactgcctg cgtgagattc tcgcatgccg gagatcctat ttttggaat caaatcattc	2820
cggatactgc gatttttaagt gttgttccat tccatcacgg ttttggaatg tttactacac	2880
tcggatattt gatatgtgga tttcgagtcg tcttaatgta tagatttgaa gaagagctgt	2940
ttctgaggag ccttcaggat tacaagattc aaagtgcgct gctggtgcc accctattct	3000
ccttcttcgc caaaagcact ctgattgaca aatacgattt atctaattta cacgaaattg	3060
cttctggtgg cgctcccctc tctaaggaag tcggggaagc gggttgccaag aggttccatc	3120
tgccaggat caggcaagga tatgggctca ctgagactac atcagctatt ctgattacac	3180
ccgaggggga tgataaaccg ggcgcggctg gtaaagttgt tccatTTTTT gaagcgaagg	3240
ttgtggatct ggataccggg aaaacgctgg gcgttaatca aagaggcgaa ctgtgtgtga	3300

gaggtcctat gattatgtcc ggttatgtaa acaatccgga agcgaccaac gccttgattg	3360
acaaggatgg atggctacat tctggagaca tagcttactg ggacgaagac gaacacttct	3420
tcatcgttga ccgcctgaag tctctgatta agtacaaagg ctatcagggtg gctcccgtg	3480
aattggaatc catcttgctc caacacccca acatcttcga cgcagggtgtc gcaggctctc	3540
ccgacgatga cgccgggtgaa cttcccgcgc ccgttgttgt tttggagcac ggaaagacga	3600
tgacggaaaa agagatcgtg gattacgtcg ccagtcaagt aacaaccgcg aaaaagttgc	3660
gcggaggagt tgtgtttgtg gacgaagtac cgaaaggctt taccggaaaa ctgcacgcaa	3720
gaaaaatcag agagatcctc ataaaggcca agaagggcgc aaagatcgcc gtgtaatcta	3780
gagggcccta ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctgcactgtg	3840
ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc cctccccgcg tgccttcctt gaccctggaa	3900
ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt	3960
aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa	4020
gacaatagca ggcattgctg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc	4080
agctggggct cgacctgggtc caaagaccag agggctattg agacttttca acaaagggtg	4140
atatcgggaa acctcctcgc attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca	4200
gtagaaaagg aagatggctt ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcggt	4260
caagatgcct ctaccgacag tgggtcccaa gatggacccc caccacgag gaacatcgtg	4320
gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tacatggtgg	4380
agcacgacac tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccagaggg	4440
ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc cattgcccag	4500
ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag aaaaggaaga tggcttctac aaatgccatc	4560
attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag atgcctctac cgacagtggg cccaaagatg	4620
gacccccacc cacgaggaac atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc	4680
aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt	4740
cgcaagaccc ttcctctata taagggaagt catttcattt ggagaggaca cgctgagttc	4800
acaacacaaa tcagatttat agagagattt ataaaaaaaa aaaaacatgt gatcccggga	4860
attcgctagc actagaggat ccccggggtac cggtcgccac cctagagtcg cggccgcttt	4920
acttgtagag ctcggtccatg ccgagagtga tcccggcggc ggtcacgaac tccagcagga	4980
ccatgtgatc gcgcttctcg ttggggctct tgctcagggc ggactgggtg ctcaggtagt	5040
ggttgctcggg cagcagcacg gggccgtcgc cgatgggggt gttctgctgg tagtggctcg	5100
cgagctgcac gctgccgtcc tcgatgttgt ggcggatctt gaagttcacc ttgatgccgt	5160
tcttctgctt gtcggccatg atatagacgt tgtggctgtt gtagttgtac tccagcttgt	5220

ES 2 842 211 T3

gccccaggat gttgccgtcc tccttgaagt cgatgccctt cagctcgatg cggttcacca	5280
gggtgtcgcc ctogaacttc acctcggcgc gggtcttgta gttgccgtcg tccttgaaga	5340
agatgggtgcg ctccctggacg tagccttcgg gcatggcgga cttgaagaag tcgtgctgct	5400
tcatgtggtc ggggtagcgg ctgaagcact gcacgccgta ggtcagggtg gtcacgaggg	5460
tgggccaggg cacgggcagc ttgccgggtgg tgcagatgaa cttcagggtc agcttgccgt	5520
aggtggcatc gccctcgccc tcgccggaca cgctgaactt gtggccggtt acgtcgccgt	5580
ccagctcgac caggatgggc accaccccg tgaacagctc ctgcccttg ctcaccatag	5640
tccgcaaaaa tcaccagtct ctctctacaa atctatctct ctctatcttt ctcagaata	5700
atgtgtgagt agttcccaga taagggaatt agggttctta tagggtttcg ctcagtgttt	5760
gagcatataa gaaaccctta gtatgtatct gtatttgtaa aatacttcta tcaataaaat	5820
ttctaattcc taaaacccaa atccagtgc cgggcggcgg ctcgag	5866

<210> 11
 <211> 6153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pTRAC

<400> 11

aattccgccc ctagaaatat ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa	60
gtgctccatt tttattaact ttaaataatt ggttgtacga tcactttctt atcaagcgtt	120
actaaaatgc gtcaatctct ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaatct	180
ttatatatct ttttcgaatt tgaagtgaat ttctgataat ttaaaattaa atagaacata	240
tcattattta ggtgtcatat tgatttttat acttaattac taaatttggt taactttgaa	300
agtgtacatc aacgaaaaat tagtcaaacy actaaaataa ataaatatca tgtgttatta	360
agaaaattct cctataagaa tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt	420
tactaacaca tatatttact tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat	480
ctaacaaaaa aaaaccagaa aatgctgaaa acccgcaaaa accgaaccaa tccaaaccga	540
tatagttggg ttggtttgat tttgatataa accgaaccaa ctgggtccat ttgcaccctt	600
aatcataata gctttaatat ttcaagatat tattaagtta acgttgtcaa tatcctggaa	660
atcttgcaaa atgaatcaag cctatatggc tgtaatatga atttaaaagc agctcgatgt	720
gggtggaata tgtaatttac ttgattctaa aaaaatatcc caagtattaa taatttctgc	780
taggaagaag gttagctacg atttacagca aagccagaat acaaagaacc ataaagtgat	840
tgaagctcga aatatacgaa ggaacaaata tttttaaaaa aatacgcaat gacttggaac	900

aaaagaaagt gatataat	ttgttcttaa acaagcatcc	cctctaaaga atggcagttt	960	
tcctttgcat gtaactatta	tgctcccttc gttacaaaaa	ttttggacta ctattggg	1020	
cggggcgcgc ccggtccaaa	gaccagaggg ctattgagac	ttttcaacaa agggtaatat	1080	
cgggaaacct cctcggattc	cattgcccag ctatctgtca	cttcatcgaa aggacagtag	1140	
aaaaggaaga tggcttctac	aaatgccatc attgcgataa	aggaaaggct atcgttcaag	1200	
atgcctctac cgacagtggg	cccaaagatg gacccccacc	cacgaggaac atcgtggaaa	1260	
aagaagacgt tccaaccacg	tcttcaaagc aagtggattg	atgtgataca tgggtggagca	1320	
cgacactctc gtctactcca	agaatatcaa agatacagtc	tcagaagacc agagggctat	1380	
tgagactttt caacaaaggg	taatatcggg aaacctctc	ggattccatt gccagctat	1440	
ctgtcacttc atcgaaagga	cagtagaaaa ggaagatggc	ttctacaaat gccatcattg	1500	
cgataaagga aaggctatcg	ttcaagatgc ctctaccgac	agtgggtcca aagatggacc	1560	
cccaccacg aggaacatcg	tggaaaaaga agacgttcca	accacgtctt caaagcaagt	1620	
ggattgatgt gatatctcca	ctgacgtaag ggatgacgca	caatcccact atccttcgca	1680	
agacccttcc tctatataag	gaagttcatt tcatttggag	aggacacgct gaattcacia	1740	
cacaaatcag atttatagag	agatttataa aaaaaaaaaa	acatgtctcg agctcggatc	1800	
ctctagagtc cgcaaaaatc	accagtctct ctctacaaat	ctatctctct ctatttttct	1860	
ccagaataat gtgtgagtag	ttcccagata agggaattag	ggttcttata gggtttcgct	1920	
catgtgttga gcatataaga	aacccttagt atgtatttgt	atttgtaaaa tacttctatc	1980	
aataaaat	ctaattccta aaaccaa	at ccagtgaccg ggcggccggc	cgccccctaga	2040
aatatttgcg actcttctgg	catgtaatat ttcggt	taaat atgaagtgt	ccat	2100
taactttaaa taattggttg	tacgatcact ttcttatcaa	gcgttactaa aatgcgtcaa	2160	
tctctttgtt ctcccatatt	catatgtcaa aatctatcaa	aattcttata tatcttttct	2220	
gaatttgaag tgaaattt	cg ataattttaa attaaataga	acatatcatt atttaggtgt	2280	
catattgatt tttatactta	attactaaat ttgggt	taact ttgaaagtgt	acatcaacga	2340
aaaattagtc aaacgactaa	aataaataaa tatcatgtgt	tattaagaaa attctcctat	2400	
aagaatattt taatagatca	tatgtttgta aaaaaa	atta atttttacta	acacatatat	2460
ttacttatca aaaatttgac	aaagtaagat taaaataata	ttcatctaac aaaaaaaac	2520	
cagaaaatgc tgaaaacc	cg gcaaaaccga accaatccaa	accgatatag ttggtttgg	2580	
ttgat	ttttga tataaaccga	accaactcgg tccatttgca	ccccta	2640
aatatttcaa gatattatta	agttaacggt gtcaatatcc	tggaaat	ttt gcaaaatgaa	2700
tcaagcctat atggctgtaa	tatgaattta aaagcagctc	gatgtggtgg taatatgtaa	2760	
tttacttgat tctaaaaaaa	tatcccaagt attaataatt	tctgctagga agaagg	ttag	2820

ctacgattta cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctcgaaatat	2880
acgaaggaac aaatatTTTT aaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat	2940
attttttgtt cttaaacaag catcccctct aaagaatggc agttttcctt tgcagtgaac	3000
tattatgctc ctttcgttac aaaaattttg gactactatt gggcgggtgg agggggatca	3060
gattgtcgtt tcccgccttc agtttaaact atcagtgttt gacaggatat attggcgggt	3120
aaacctaaga gaaaagagcg tttattagaa taatcggata tttaaaaggc cgtgaaaagg	3180
tttatccgtt cgtccatttg tatgtgtaca tcaccgacga gcaaggcaag accgagcgcc	3240
tttccgacgc tcaccgggct ggttgccctc gccgctgggc tggcggccgt ctatggccct	3300
gcaaacgcgc cagaaacgcc gtcgaagccg tgtgcgagac accggccgcc ggcgttgtgg	3360
atacctcgcg gaaaacttgg ccctcactga cagatgaggg gcggacgttg acacttgagg	3420
ggccgactca cccggcgcgg cgttgacaga tgaggggacg gctcgatttc ggccggcgac	3480
gtggagctgg ccagcctcgc aaatcggcga aaacgcctga ttttacgcga gtttccaca	3540
gatgatgtgg acaagcctgg ggataagtgc cctgcggtat tgacacttga ggggcgcgac	3600
tactgacaga tgaggggagc gatccttgac acttgagggg cagagtgtg acagatgagg	3660
ggcgaccta ttgacatttg aggggctgtc cacaggcaga aaatccagca tttgcaagg	3720
tttccgcccg tttttcggcc accgctaacc tgtcttttaa cctgctttta aaccaatatt	3780
tataaacctt gtttttaacc agggctgcgc cctgtgcgcg tgaccgcgca cgccgaagg	3840
gggtgcccc ccttctcgaa ccctcccgcc ccgctaacgc gggcctcca tccccccagg	3900
ggctgcgccc ctccggccgcg aacggcctca cccaaaaaat ggcagcgctg gcagtccctg	3960
ccattgccgg gatcggggca gtaacgggat gggcgatcag cccgacaagc taccctatt	4020
tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa	4080
atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttcg tgtcgccctt	4140
attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa	4200
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac	4260
agcggtgaag tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt	4320
aaagtctctc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgg	4380
cggcgcatc actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat	4440
cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat gagtataac	4500
actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg	4560
cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc	4620
ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa	4680

ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag 4740
 gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct 4800
 gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat 4860
 ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa 4920
 cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac 4980
 caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 5040
 taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 5100
 cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg 5160
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggg ttgtttgccg 5220
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 5280
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 5340
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc 5400
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 5460
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 5520
 ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 5580
 ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 5640
 tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg atttttgtga 5700
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 5760
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg gactctagct agaggatcac aggcagcaac 5820
 gctctgtcat cgttacaatc aacatgctac cctccgcgag atcatccgtg tttcaaacc 5880
 ggcagcttag ttgccgttct tccgaatagc atcggtaaca tgagcaaagt ctgccgcctt 5940
 acaacggctc tcccgtgac gccgtcccg actgatgggc tgccgtgac gagtggtgat 6000
 tttgtgccga gctgccggtc ggggagctgt tggctggctg gtggcaggat atattgtggt 6060
 gtaaacaaat tgacgcttag acaacttaat aacacattgc ggacgttttt aatgatcgaa 6120
 tactaacgtc tctaccacat tgaagagcaa gct 6153

<210> 12
 <211> 5937
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pRIC 3.0

<400> 12

gaagagcgtg actccgaggg gttgcctcaa actctatctt ataaccggcg tggaggcatg 60
 gaggcagggg tattttgggtc attttaatag atagtggaaa atgacgtgga atttacttaa 120

agacgaagtc	tttgcgacaa	gggggggccc	acgccgaatt	taatattacc	ggcgtggccc	180
ccccttatcg	cgagtgcctt	agcacgagcg	gtccagattt	aaagtagaaa	atttcccgcc	240
cactaggggt	aaaggtgttc	acactataaa	agcatatacg	atgtgatggg	atttgctcga	300
cctgggtccaa	agaccagagg	gctattgaga	cttttcaaca	aagggttaata	tcgggaaacc	360
tcctcggatt	ccattgcccc	gctatctgtc	acttcatcga	aaggacagta	gaaaaggaag	420
atggcttcta	caaatgccat	cattgcgata	aaggaaaggc	tatcggtcaa	gatgcctcta	480
ccgacagtgg	tcccaaagat	ggacccccac	ccacgaggaa	catcgtggaa	aaagaagacg	540
ttccaaccac	gtcttcaaag	caagtggatt	gatgtgatac	atggtggagc	acgacactct	600
cgtctactcc	aagaatatca	aagatacagt	ctcagaagac	cagagggcta	ttgagacttt	660
tcaacaaagg	gtaatatcgg	gaaacctcct	cggattccat	tgcccagcta	tctgtcactt	720
catcgaaaagg	acagtagaaa	aggaagatgg	cttctacaaa	tgccatcatt	gcgataaagg	780
aaaggctatc	gttcaagatg	cctctaccga	cagtgggtccc	aaagatggac	ccccaccac	840
gaggaacatc	gtggaaaaaag	aagacgttcc	aaccacgtct	tcaaagcaag	tggattgatg	900
tgatatctcc	actgacgtaa	gggatgacgc	acaatcccac	tatccttcgc	aagacccttc	960
ctctatataa	ggaagttcat	ttcatttgga	gaggacacgc	tgagttcaca	acacaaatca	1020
gatttataga	gagatttata	aaaaaaaaaa	aacatgtgat	cccgggaatt	cgctagcact	1080
agtaagcttg	tcgactcgag	ctctctagag	tccgcaaaaa	tcaccagtct	ctctctacaa	1140
atctatctct	ctctattttt	ctccagaata	atgtgtgagt	agttcccaga	taagggaatt	1200
agggttctta	tagggtttcg	ctcatgtgtt	gagcatataa	gaaaccctta	gtatgtattt	1260
gtatttgtaa	aatacttcta	tcaataaaat	ttctaattcc	taaaaccaa	atccagtgc	1320
cgggcggcgg	gtcgagaatg	attattttat	gaatatattt	cattgtgcaa	gtagatagaa	1380
attacatatg	ttacataaca	cacgaaataa	acaaaaaaag	acaatccaaa	aacaaacacc	1440
ccaaaaaaa	taatcacttt	agataaaact	gtatgaggag	aggcacgttc	agtgactcga	1500
cgattcccga	gcaaaaaaag	tctccccgtc	acacatatag	tgggtgacgc	aattatcttt	1560
aaagtaatcc	ttctgttgac	ttgtcattga	taacatccag	tcttcgtcag	gattgcaaag	1620
aattatagaa	gggatcccac	cttttatttt	cttctttttt	ccatatttag	ggttgacagt	1680
gaaatcagac	tggcaacctt	ttaattgctt	ccacaatggg	acgaacttga	aggggatgtc	1740
gtcgatgata	ttataggtgg	cgtgttcata	gtagttgggtg	aaatcgatgg	taccgttcca	1800
atagttgtgt	cgtccgagac	ttctagccca	ggtgggtctt	ccggtacgag	ttgggtccga	1860
gatgtagagg	ctgggggtgtc	ggattccatt	ccttccattg	tcctgggttaa	atcggccatc	1920
cattcaaggt	cagattgagc	ttgttggtat	gagacaggat	gtatgtaagt	ataagcgtct	1980

atgcttacat ggtatagatg ggtttccctc caggagtgtg gatcttcgtg gcagcgaaga	2040
tctgattctg tgaagggcga cacatacggg tcaaggttgtg gagggaataa tttgttggt	2100
gaatattcca gccattgaag tttgttgcc cattcatgag ggaattcttc cttgatcatg	2160
tcaagatatt cctccttaga cggtgcagtc tggataatag ttctccatcg tgcgtcagat	2220
ttgcgaggag agaccttatg atctcgaaa tctcctctgg ttttaatatc tccgtccttt	2280
gatatgtaat caaggacttg tttagagttt ctagctgggt ggatattagg gtgatttct	2340
tcaaaatcga aaaaagaagg atccctaata caaggttttt tatcaagctg gagaagagca	2400
tgatagtggg tagtgccatc ttgatgaagc tcagaagcaa caccaaggaa gaaaataaga	2460
aaagggtgtga gtttctccca gagaaactgg aataaatcat ctctttgaga tgagcacttg	2520
ggataggtaa ggaaaacata tttagattgg agtctgaagt tcttactagc agaaggcatg	2580
ttgttgtgac tccgaggggt tgcctcaaac tctatcttat aaccggcgtg gaggcattga	2640
ggcaggggta ttttggtcat tttaatagat agtggaaaat gacgtggaat ttacttaaag	2700
acgaagtctt tgcgacaagg gggggccccc gccgaattta atattaccgg cgtggccccc	2760
ccttatcgcg agtgcttttag cacgagcggg ccagatttaa agtagaaaat ttcccgccca	2820
ctagggttaa aggtgttcac actatacaag catatacgat gtgatggtat tgactagagt	2880
ttaaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa cctaagagaa aagagcgttt	2940
attagaataa tcggatattt aaaagggcgt gaaaaggttt atccgttcgt ccatttgtat	3000
gtgtacatca ccgacgagca aggcaagacc gagcgccttt ccgacgctca ccgggctggt	3060
tgccctcgcc gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca aacgcgccag aaacgcgctc	3120
gaagccgtgt gcgagacacc ggccgcggc gttgtggata cctcgcgga aacttgcccc	3180
tactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc cgactcacc ccgcgggcgt	3240
tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa	3300
tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat gatgtggaca agcctgggga	3360
taagtgccct gcggtattga cacttgagg ggcgcgactac tgacagatga ggggcgcat	3420
ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc gcacctattg acatttgagg	3480
ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt ccgcccgttt ttcgccacc	3540
gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat aaaccttgtt ttttaaccagg	3600
gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg tgccccccct tctcgaacct	3660
tcccgcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc tgcgcccctc ggccgcgaac	3720
ggcctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca ttgccgggat cggggcagta	3780
acgggatggg cgatcagccc gaaagctacc cctatttggt tatttttcta aatacattca	3840
aatatgtatc cgctcatgag acaataacct tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg	3900

aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc	3960
cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg	4020
ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt	4080
cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtg	4140
ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat	4200
gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga	4260
gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca	4320
acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact	4380
cgccttgatc gttggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc	4440
acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact	4500
ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt	4560
ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt	4620
gggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt	4680
atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata	4740
ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag	4800
attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat	4860
ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa	4920
aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca	4980
aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt	5040
ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg	5100
tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata	5160
ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga	5220
cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc	5280
agcttgagc gaacgacct caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc	5340
gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca	5400
ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg	5460
tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta	5520
tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct	5580
cacatggact ctagctagag gatcacaggc agcaacgctc tgtcatcggt acaatcaaca	5640
tgctaccctc cgcgagatca tccgtgtttc aaaccggcga gcttagttgc cgttcttccg	5700
aatagcatcg gtaacatgag caaagtctgc cgccttacia cggtctccc gctgacgccg	5760

ES 2 842 211 T3

tccccggactg atgggctgcc tgtatcgagt ggtgattttg tgccgagctg ccggtcgggg	5820
agctgtttggc tggctggtgg caggatatat tgtggtgtaa acaaattgac gcttagacaa	5880
cttaataaca cattgcggac gtttttaatg atcgaatact aacgtctcta ccacatt	5937

<210> 13

<211> 1548

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Codón humano optimizado VPH-16 L1

<400> 13

ttaattaagc ttgaattcgc cgccaccatg tccctgtggc tgcccagcga ggccaccgtg	60
tacctgcccc ccgtgcccgt gagcaagggtg gtgagcaccg atgagtacgt ggcccggacc	120
aacatctact accacgccgg cacctccaga ctgctggccg tggggcacc ctaactcccc	180
atcaagaagc ccaacaacaa caagatcctg gtgcccagg tgagcggcct gcaataccgg	240
gtgttcagaa tccacctgcc cgaccccaat aagttcgggt tccccgacac cagcttctac	300
aaccccgaca cccagagact ggtgtggggc tgcgtgggcg tggaggtggg cagaggccag	360
cctctgggcg tgggcatcag cgccaccct ctgctgaaca agctggacga caccgagaac	420
gccagcgcct acgccgcaa cgccggcgtg gataacagag aatgcatcag catggactac	480
aagcagaccc agctgtgcct catcggctgc aagccccca tcggcgagca ctggggcaag	540
ggcagcccct gcaccaacgt ggccgtgaat cctggcgact gtcctcccct ggaactcatc	600
aacaccgtga tccaggacgg cgacatggtg gacaccggct tcggcgccat ggacttcacc	660
accctccagg ccaataagag cgagggtgcc ctggacatct gcaccagcat ctgcaagtac	720
cccgactaca tcaagatggt gagcgagccc tacggcgata gcctgttctt ctacctgcgg	780
cgggagcaga tgttcgtgcg gcacctgttc aacagagccg gcgccgtggg cgagaacgtg	840
cccgacgacc tgtacatcaa gggcagcggc agcaccgcca acctggccag cagcaactac	900
ttccctaccc ccagcggctc catggtgacc agcgacgccc agatcttcaa caagccctac	960
tggctccaga gagcccagg ccacaacaat ggcattctgt ggggcaacca gctgttcgtg	1020
accgtggtgg ataccacccg gagcaccaac atgtccctgt gcgcggccat cagcaccagc	1080
gagaccacct acaagaacac caacttcaag gagtacctga ggcacggcga ggagtacgac	1140
ctccagttca tcttccagct gtgcaagatc accctcaccg ccgacgtgat gacctacatc	1200
cacagcatga acagcaccat cctggaggac tggaaacttc gcctgcagcc ccctcctggc	1260
ggcaccctgg aggacaccta cagattcgtg accagccagg ccatcgcatg ccagaagcac	1320
accctccccg cccctaagga ggacccccctg aagaagtaca ccttctggga ggtgaacctg	1380
aaggagaagt tcagcgccga cctggaccag ttccctctgg gcagaaagtt cctgctgcaa	1440

ES 2 842 211 T3

gccggcctga aggccaagcc taagttcacc ctgggcaaga gaaaggccac ccccaccaca 1500

agcagcacca gcaccaccgc caagcggaag aagcgcaagc tgtgatag 1548

<210> 14

<211> 1440

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Codón humano optimizado VPH-16 L2

<400> 14

tctagagcca ccatgaggca caagaggagc gccaaagagga ccaagagggc cagcgccacc 60

cagctgtaca agacctgcaa gcaggccggc acctgcccc cgcacatcat cccaaggtg 120

gagggcaaga ccatcgccga ccagatcctg cagtacggca gcatgggcgt gttcttcggc 180

ggcctgggca tcggcaccgg cagcggcacc ggcggcagga ccggctacat cccctgggc 240

accaggcccc ccaccgccac cgacaccctg gcccccgta gggccccct gaccgtggac 300

cccgtgggccc ccagcgaccc cagcatcgtg agcctggtgg aggagaccag cttcatcgac 360

gccggcgccc ccaccagcgt gccacgcatc cccccgacg tgagcggctt cagcatcacc 420

accagcaccg acaccacccc cgccatcctg gacatcaaca acaccgtgac caccgtgacc 480

accacaaca accccacctt caccgacccc agcgtgctgc agccccccac ccccgccgag 540

accggcggcc acttcaccct gagcagcagc accatcagca cccacaacta cgaggagatc 600

cccatggaca cttcatcgt gagcaccaac cccaacaccg tgaccagcag ccccccatc 660

cccggcagca gggccgtggc caggctgggc ctgtacagca ggaccacca gcaggtgaag 720

gtggtggacc ccgccttcgt gaccaccccc accaagctga tcacctacga caaccgcgc 780

tacgagggca tcgacgtgga caacaccctg tacttcagca gcaacgacaa cagcatcaac 840

atcgcccccg accccgactt cctggacatc gtggccctgc acaggcccg cctgaccagc 900

aggaggaccg gcatcaggta cagcaggatc ggcaacaagc agaccctgag gaccaggagc 960

ggcaagagca tcggcgccaa ggtgcactac tactacgacc tgagcaccat cgaccccgcc 1020

gaggagatcg agctgcagac catcaccccc agcacctaca ccaccaccag ccacgcgcgc 1080

agccccacca gcatcaacaa cggcctgtac gacatctacg ccgacgactt catcacgcgc 1140

accagcacca cccccgtgcc cagcgtgccc agcaccagcc tgagcggcta catccccgc 1200

aacaccacca tccccctcgg cggcgccctac aacatcccc tggtagcgg ccccgacatc 1260

cccatcaaca tcaccgacca ggcccccagc ctgatcccca tcgtgcccgg cagccccag 1320

tacaccatca tcgccgacgc cggcgacttc tacctgcacc ccagctacta catgctgagg 1380

aagaggagga agaggctgcc ctacttcttc agcgacgtga gcctggccgc ctgaaagctt 1440

<210> 15

<211> 8310
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> pRIC3 mSEAP SV40ori

<400> 15

gaagagcgtg actccgaggg gttgcctcaa actctatcctt ataaccggcg tggaggcatg	60
gaggcagggg tatttttggtc attttaatag atagtggaaa atgacgtgga atttacttaa	120
agacgaagtc tttgcgacaa gggggggccc acgccgaatt taatattacc ggcgtggccc	180
ccccttatcg cgagtgcctt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa atttcccgcc	240
cactaggggt aaagggtgtc aactataaaa agcatatacg atgtgatggt atttggtcga	300
cacgcgtcac gtgagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctactactt	360
ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa aaattagtca	420
gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag	480
gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcttgctt tgcatacttc tgctgctgg	540
ggagcctggg gactttccac acctggttgc tgactaattg agatgcttgc tttgcatact	600
tctgcctgcc tggggagcct ggggactttc cacaccgtcg acggatcctt atcgatttta	660
ccacatttgt agaggtttta ctgctttta aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga	720
aacataaaat gaatgcaatt gttgttggtt acttgtttat tgcagcttat aatggttaca	780
aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt	840
gtggtttgtc caaactcatc aatgtatcct atcatgtctg ctggaagcgg ccggccgccc	900
cgactctaga gtaaccggg tgcgcggcgt cgggtggtgcc ggcggggggc gccaggtcgc	960
aggcgggtga gggctccagg caggcggcga aggccatgac gtgcgctatg aaggctctgt	1020
cctgcacgcc gtgaaccagg tgcgcctgcg ggcgcgcgc gaacaccgcc acgtcctcgc	1080
ctgcgtgggt ctcttcgtcc aggggcactg ctgactgctg ccgatactcg gggctcccgc	1140
tctcgtctc ggtaacatcc ggccgggcgc cgtccttgag cacatagcct ggaccgtttc	1200
cgtataggag gaccgtgtag gccttcctgt cccgggcctt gccagggggc agcccgaaga	1260
tggagctccc tcgcaggggg tagcctccga aggagaagac gtgggagtgg tcggcagtga	1320
cgaggctcag cgtgtcctcc tcgctggtga gctggccgc cctctcaatg gcgtcgtcga	1380
acatgatcgt ctcagtcagt gcccggtaag ccctgctttc atgatgacca tggtcgatgc	1440
gaccaccctc cacgaagagg aagaagccgc gggggttcct gctcagcagg cgcagggcag	1500
cctctgtcat ctccatcagg gaggggtcca gtgtggagtc tcggtggatc tcgtatttca	1560
tgtctccagg ctcaaagaga cccatgagat gggtcacaga cgggtccagg gaagcctgca	1620

10

tgagctcagt	gcggttccac	acataccggg	caccttggcg	cttcgccagc	cattcctgca	1680
ccagattctt	cccgtccagc	ctggtcccac	cttggctgta	gtcatctggg	tactcaggg	1740
ctgggggttc	catgcgaaac	atgtactttc	ggcctccacc	taggatcacg	tcaatgtcca	1800
tgttggagat	gagctgcgta	gcgatgtcct	ggcacccttc	ctggcggggc	gaggcaggca	1860
cgtcggcgtc	cgagtaccag	ttgcggttca	ccgtgtgggc	gtaggtgccg	gctggcgagg	1920
cgtgctgcac	tctgttggtg	gttaccactc	ccactgactt	ccctgctttc	ttggcccgat	1980
tcatcacgga	gatgacctcg	ttgccgcgtg	tctgtttgca	ctggttaaag	cgggcggctg	2040
cactcaagcc	aatggtctgg	aagttgccct	tgaccccgca	caggtaggcc	gtggctgtgg	2100
ctccactgtc	tggcacatgt	ttgtctacat	tgtatgtctt	ggacagagcc	acatatggga	2160
agcgggtccat	ggccaggggt	atctcaggcc	ccagtttgtc	cttcttctgc	ccttttagga	2220
tcctggcagc	tgtcaccgta	gacaccccca	tcccatcgcc	caggaagatg	atgaggttct	2280
tggcggctgt	ctgtgcaggc	tgcagcttct	tggcggcacc	cagggcctcg	gctgcctcgc	2340
ggttccagaa	gtccgggttc	tcctcctcaa	ctgggatgat	gcccagggag	agctgtagcc	2400
tcaggcccag	cagcagcagc	agcagcagca	tgggtgggca	attcgcgatt	cgaagcttac	2460
ttagatcgca	gatccagcac	aatggatctc	gaggtcgagg	gatctctaca	gaattctcac	2520
gacacctgaa	atggaagaaa	aaaactttga	accactgtct	gaggcttgag	aatgaaccaa	2580
gatccaaaact	caaaaagggc	aaattccaag	gagaattaca	tcaagtgcc	agctggccta	2640
acttcagtct	ccaccactc	agtgtgggga	aactccatcg	cataaaaccc	ctccccccaa	2700
cctaaagacg	acgtactcca	aaagctcgag	aactaatcga	ggtgcctgga	cggcgcccgg	2760
tactccgtgg	agtcacatga	agcgacggct	gaggacggaa	aggccctttt	cctttgtgtg	2820
ggtgactcac	ccgcccgtc	tcccagagcg	cgcgtcctcc	attttgagct	ccctgcagca	2880
gggcccgggaa	gcggccatct	ttccgtcac	gcaactggtg	ccgaccgggc	cagccttgcc	2940
gcccagggcg	gggcgataca	cggcggcgcg	aggccaggca	ccagagcagg	ccggccagct	3000
tgagactacc	cccgtccgat	tctcgggtgg	cgcgctcgca	ggccccgcct	cgccgaacat	3060
gtgcgctggg	acgcacgggc	cccgtcgccg	cccgcggccc	caaaaaccga	aataccagtg	3120
tgcagatctt	ggcccgcat	tacaagacta	tcttgccaga	aaaaaagcgt	cgcagcaggt	3180
catcaaaaaat	tttaaagtgc	tagagactta	tcgaaagcag	cgagacaggc	gcgaagggtg	3240
caccagattc	gcacgcggcg	gccccagcgc	ccaggccagg	cctcaactca	agcacgaggc	3300
gaaggggctc	cttaagcgca	aggcctcgaa	ctctcccacc	cacttccaac	ccgaagctcg	3360
ggatcaagaa	tcacgtactg	cagccagggtg	gaagtaattc	aaggcacgca	agggccataa	3420
cccgtaaaga	ggccaggccc	gcgggaacca	cacacggcac	ttacctgtgt	tctggcggca	3480

aacccggttgc gaaaaagaac gttcacggcg actactgcac ttatatacgg ttctccccc	3540
ccctcgggaa aaaggcggag ccagtacacg acatcacttt ccagttttac cccgcgccac	3600
cttctctagg caccggttca attgccgacc cctcccccca acttctcggg gactgtgggc	3660
gatgtgcgct ctgcccactg acgggcaccg gagccaattc ccagtcgaga atgattat	3720
tatgaatata tttcattgtg caagtagata gaaattacat atgttacata acacacgaaa	3780
taaacaaaaa aagacaatcc aaaaacaaac accccaaaaa aaataatcac tttagataaa	3840
ctcgtatgag gagaggcacg ttcagtgact cgacgattcc cgagcaaaaa aagtctcccc	3900
gtcacacata tagtgggtga cgcaattatc tttaaagtaa tccttctggt gacttgtcat	3960
tgataacatc cagtcttcgt caggattgca aagaattata gaagggatcc caccttttat	4020
tttcttcttt tttccatatt tagggttgac agtgaaatca gactggcaac ctattaattg	4080
cttccacaat gggacgaact tgaaggggat gtcgtcgatg atattatagg tggcgtgttc	4140
atcgtagtgt gtgaaatcga tggtagcgtt ccaatagtgt tgcgtccga gacttctagc	4200
ccaggtggtc tttccggtac gagttgggtc gcagatgtag aggctggggt gtcggattcc	4260
attccttcca ttgtcctggt taaatcggcc atccattcaa ggtcagattg agcttgttgg	4320
tatgagacag gatgtatgta agtataagcg tctatgctta catggtatag atgggtttcc	4380
ctccaggagt gtagatcttc gtggcagcga agatctgatt ctgtgaaggg cgacacatac	4440
ggttcagggt gtggagggaa taatttggtg gctgaatatt ccagccattg aagttttgtt	4500
gcccattcat gagggaattc ttccttgatc atgtcaagat attcctcctt agacgttgca	4560
gtctggataa tagttctcca tcgtgcgtca gatttgcgag gagagacctt atgatctcgg	4620
aaatctcctc tggttttaat atctccgtcc tttgatatgt aatcaaggac ttgttttagag	4680
tttctagctg gctggatatt agggtgattt ccttcaaaat cgaaaaaaga aggatcccta	4740
atacaagggt ttttatcaag ctggagaaga gcatgatagt gggtagtgcc atcttgatga	4800
agctcagaag caacaccaag gaagaaaata agaaaagggtg tgagtttctc ccagagaaac	4860
tgggaataaat catctctttg agatgagcac ttgggatagg taaggaaaac atatttagat	4920
tggagtctga agttcttact agcagaaggc atgttggtgt gactccgagg gggtgcctca	4980
aactctatct tataaccggc gtggaggcat ggaggcaggg gtattttggt cattttaata	5040
gatagtggaa aatgacgtgg aatttactta aagacgaagt ctttgcgaca agggggggcc	5100
cacgccgaat ttaatattac cggcgtggcc ccccttatac gcgagtgtt tagcacgagc	5160
ggtccagatt taaagtagaa aatttccgc ccactagggt taaagggtgt cacactatac	5220
aagcatatac gatgtgatgg tattgactag agtttaaact atcagtgtt gacaggatat	5280
attggcgggt aaacctaaaga gaaaagagcg tttattagaa taatcgata tttaaaagg	5340
cgtgaaaagg tttatccgtt cgtccatttg tatgtgtaca tcaccgacga gcaaggcaag	5400

accgagcgcc	tttccgacgc	tcaccggggt	ggttgccctc	gccgctgggc	tggcggccgt	5460
ctatggccct	gcaaacgcgc	cagaaacgcc	gtcgaagccg	tgtgcgagac	accggccgcc	5520
ggcgttgttg	atacctcgcg	gaaaacttgg	ccctcactga	cagatgaggg	gcggacgttg	5580
acacttgagg	ggccgactca	cccggcgcg	cgttgacaga	tgaggggcag	gctcgatttc	5640
ggccggcgac	gtggagctgg	ccagcctcgc	aaatcggcga	aaacgcctga	ttttacgcga	5700
gtttcccaca	gatgatgttg	acaagcctgg	ggataagtgc	cctgcggtat	tgacacttga	5760
ggggcgcgac	tactgacaga	tgaggggcgc	gatccttgac	acttgagggg	cagagtgttg	5820
acagatgagg	ggcgcaccta	ttgacatttg	aggggctgtc	cacaggcaga	aaatccagca	5880
tttgcaaggg	tttccgccc	tttttcggcc	accgctaacc	tgtcttttaa	cctgctttta	5940
aaccaatatt	tataaacctt	gtttttaacc	agggtgcgc	cctgtgcgcg	tgaccgcgca	6000
cgccgaaggg	gggtgcccc	ccttctcgaa	ccctcccggc	ccgctaacgc	gggcctccca	6060
tccccccagg	ggctgcgccc	ctcgcccgcg	aacggcctca	ccccaaaaat	ggcagcgctg	6120
gcagtccctg	ccattgccgg	gatcggggca	gtaacgggat	gggcgatcag	cccgaagct	6180
accctatatt	gtttattttt	ctaaatacat	tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	6240
ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	6300
gtcgccctta	ttcccttttt	tgcggcattt	tgcccttcctg	tttttgctca	cccagaaacg	6360
ctggtgaaag	taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaactg	6420
gatctcaaca	gcggtaatag	ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	6480
agcactttta	aagttctgct	atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	6540
caactcggtc	gccgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	6600
gaaaagcatc	ttacgggatg	catgacagta	agagaattat	gcagtgctgc	cataaccatg	6660
agtataaaca	ctgcggccaa	cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	6720
gcttttttgc	acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	atcggtggga	accggagctg	6780
aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	6840
ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	6900
tggatggagg	cggataaagt	tgacaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	6960
tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgacgactg	7020
gggacagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	7080
atggatgaac	gaaatagaca	gatcgtgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	7140
ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	7200
aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	7260

ES 2 842 211 T3

ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	7320
ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaac	caccgctacc	agcggtggtt	7380
tgtttgccgg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	7440
cagataccaa	atactgttct	tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	7500
gtagcaccgc	ctacatacct	cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	7560
gataagtcgt	gtcttaccgg	gttggactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	7620
tcgggctgaa	cgggggggtt	gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	7680
ctgagatacc	tacagcgtga	gctatgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	7740
gacaggtatc	cggtaagcgg	cagggtcggg	acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	7800
ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcgcc	acctctgact	tgagcgtcga	7860
tttttgtgat	gctcgtcagg	ggggcgaggc	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcggccttt	7920
ttacggttcc	tggccttttg	ctggcctttt	gtcacatgg	actctagcta	gaggatcaca	7980
ggcagcaacg	ctctgtcatc	gttacaatca	acatgctacc	ctccgcgaga	tcatccgtgt	8040
ttcaaaccgg	gcagcttagt	tgccgttctt	ccgaatagca	tcggtaacat	gagcaaagtc	8100
tgccgcctta	caacggctct	cccgtgacg	ccgtcccggg	ctgatgggct	gcctgtatcg	8160
agtggtgatt	ttgtgccgag	ctgccggctg	gggagctggt	ggctggctgg	tggcaggata	8220
tattgtggtg	taaacaaatt	gacgcttaga	caacttaata	acacattgcg	gacgttttta	8280
atgatcgaat	actaacgtct	ctaccacatt				8310

<210> 16
 <211> 10085
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pRIC3 mSEAP+ SV40ori

<400> 16

gaagagcgtg	actccgaggg	gttgctcaa	actctatctt	ataaccggcg	tggaggcatg	60
gaggcagggg	tatttttggtc	attttaatag	atagtggaaa	atgacgtgga	atttacttaa	120
agacgaagtc	tttgcgacaa	ggggggggccc	acgccgaatt	taatattacc	ggcgtggccc	180
ccccttatcg	cgagtgtttt	agcacgagcg	gtccagattt	aaagtagaaa	atttcccgcc	240
cactaggggt	aaaggtgttc	acactataaa	agcatatacg	atgtgatggg	atttggtcga	300
cacgcgtcac	gtgagctttt	tgcaaaagcc	taggcctcca	aaaaagcctc	ctcactactt	360
ctggaatagc	tcagaggcag	aggcggcctc	ggcctctgca	taaataaaaa	aaattagtca	420
gccatggggc	ggagaatggg	cggaaactggg	cggagttagg	ggcgggatgg	gcggagttag	480
gggcgggact	atggttgctg	actaattgag	atgcttgctt	tgcatacttc	tgcctgctgg	540

ggagcctggg gactttccac acctgggttc tgactaattg agatgcttgc tttgcatact	600
tctgcctgcc tggggagcct ggggactttc cacaccgtcg acggatcctt atcgatttta	660
ccacatttgt agaggtttta ctgctttta aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga	720
aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca	780
aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt	840
gtggtttgtc caaacatcat aatgtatctt atcatgtctg ctgaagcgg ccggccgccc	900
cgactctaga gtaacccggg tgcgcggcgt cgggtggtgcc ggcggggggc gccaggtcgc	960
aggcgggtga gggctccagg caggcggcga aggccatgac gtgcgctatg aaggtctgct	1020
cctgcacgcc gtgaaccagg tgcgcctgcg ggcgcgcgc gaacaccgcc acgtcctcgc	1080
ctgcgtgggt ctcttcgtcc aggggcactg ctgactgctg ccgatactcg gggctcccgc	1140
tctcgctctc ggtaacatcc ggccgggcgc cgtccttgag cacatagcct ggaccgtttc	1200
cgtataggag gaccgtgtag gccttcctgt cccgggcctt gccaggggcc agcccgaaga	1260
tggagctccc tcgcaggggg tagcctccga aggagaagac gtgggagtgg tcggcagtga	1320
cgaggctcag cgtgtcctcc tcgctggtga gctggccgc cctctcaatg gcgtcgtcga	1380
acatgatcgt ctcagtcagt gcccggtaag ccctgctttc atgatgacca tggtcgatgc	1440
gaccaccctc cacgaagagg aagaagccgc gggggttcct gctcagcagg cgcagggcag	1500
cctctgtcat ctccatcagg gaggggtcca gtgtggagtc tcgggtggatc tcgtatttca	1560
tgtctccagg ctcaaagaga cccatgagat gggtcacaga cgggtccagg gaagcctgca	1620
tgagctcagt gcggttcac acataaccggg caccctggcg cttegccagc cattcctgca	1680
ccagattctt cccgtccagc ctggtcccac cttggctgta gtcatctggg tactcaggg	1740
ctggggttcc catgcgaaac atgtactttc ggcctccacc taggatcacg tcaatgtcca	1800
tgttgagat gagctgcgta gcgatgtcct ggcacccctc ctggcgggcc gaggcaggca	1860
cgtcggcgtc cgagtaccag ttgcggttca ccgtgtgggc gtaggtgccg gctggcgagg	1920
cgtgctgcac tcgtgtggtg gttaccactc ccactgactt ccctgctttc ttggcccgat	1980
tcatcacgga gatgacctcg ttgccgcgtg tcgtgttgca ctggttaaag cgggcggctg	2040
cactcaggcc aatggtctgg aagttgccct tgaccccgca caggtaggcc gtggctgtgg	2100
ctccactgtc tggcacatgt ttgtctacat tgtatgtctt ggacagagcc acatatggga	2160
agcggcccat ggccaggggt atctcaggcc ccagtttgct cttcttctgc ctttttagga	2220
tcctggcagc tgtcaccgta gacaccccca tcccatcgcc caggaagatg atgaggttct	2280
tggcggctgt ctgtgcaggc tgcagcttct tggcggcacc cagggcctcg gctgcctcgc	2340
ggttccagaa gtccgggttc tcctcctcaa ctgggatgat gcccaggag agctgtagcc	2400

tcaggccccag cagcagcagc agcagcagca tgggtgggcga attcgcgatt cgaagcttac	2460
ttagatcgca gatccagcac aatggatctg gaggtcgagg gatctctaga gaattcctca	2520
cgacacctga aatggaagaa aaaaactttg aaccactgtc tgaggcttga gaatgaacca	2580
agatccaaac tcaaaaaggg caaattccaa ggagaattac atcaagtgcc aagctggcct	2640
aacttcagtc tccaccact cagtgtgggg aaactccatc gcataaaacc cctcccccca	2700
acctaaagac gacgtactcc aaaagctcga gaactaatcg aggtgcctgg acggcgcccg	2760
gtactccgtg gagtcacatg aagcgacggc tgaggacgga aaggcccttt tcttttgtgt	2820
gggtgactca cccgcccgt ctcccgagcg ccgcgtcctc cattttgagc tccctgcagc	2880
agggccggga agcgggccatc tttccgctca cgcaactggg gccgaccggg ccagccttgc	2940
cgcccagggc ggggcgatac acggcgggcg gaggccaggc accagagcag gccggccagc	3000
ttgagactac ccccgctcga ttctcgggtg ccgcgtcgc agggcccgcc tcgccgaaca	3060
tgtgcgctgg gacgcacggg ccccgctcgc gcccgcgcc ccaaaaaccg aaataccagt	3120
gtgcagatct tggcccgcat ttacaagact atcttgccag aaaaaaagcg tcgcagcagg	3180
tcatcaaaaa ttttaaatgg ctagagactt atcgaaagca gcgagacagg cgcgaagggtg	3240
ccaccagatt cgcacgcggc ggccccagcg ccagggccag gcctcaactc aagcacgagg	3300
cgaaggggct ccttaagcgc aaggcctcga actctcccac ccacttccaa cccgaagctc	3360
gggatcaaga atcacgtact gcagccagggt ggaagtaatt caaggcacgc aaggggcata	3420
acccgtaaag agggccaggcc cgcgggaaacc acacacggca cttacctgtg ttctggcggc	3480
aaaccggttg cgaaaaagaa cgttcacggc gactactgca cttatatacg gttctcccc	3540
accctcgga aaaaggcgga gccagtacac gacatcactt tcccagttta ccccgcgcca	3600
ccttctctag gcaccggttc aattgccgac ccctcccccc aacttctcgg ggactgtggg	3660
cgatgtgcgc tctgcccact gacgggcacc ggagccaatt ccagtcgac ctgggtccaa	3720
gaccagaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc	3780
cattgcccag ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag aaaaggaaga tggcttctac	3840
aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag atgcctctac cgacagtgg	3900
cccaaagatg gacccccacc cacgaggaac atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg	3960
tcttcaaagc aagtggattg atgtgataca tgggtggagca cgacactctc gtctactcca	4020
agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc agagggtat tgagactttt caacaaaggg	4080
taatatcggg aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttc atcgaaagga	4140
cagtagaaaa ggaagatggc ttctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggctatcg	4200
ttcaagatgc ctctaccgac agtgggtcca aagatggacc cccaccacg aggaacatcg	4260
tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatctcca	4320

ctgacgtaag	ggatgacgca	caatcccact	atccttcgca	agacccttcc	tctatataag	4380
gaagttcatt	tcatttggag	aggacacgct	gagttcacia	cacaaatcag	atttatagag	4440
agatttataa	aaaaaaaaa	acatgtgatc	ccgggaattc	gctagcacta	gagtgtgatc	4500
ccgggaattc	gctagcacta	gagtcgcggc	cgttttactt	gtacagctcg	tccatgccga	4560
gagtgatccc	ggcggcggtc	acgaactcca	gcaggaccat	gtgatcgcg	ttctcgttgg	4620
ggtctttgct	cagggcggtc	tgggtgctca	ggtagtggtt	gtcgggcagc	agcacggggc	4680
cgtcgccgat	gggatgttc	tgctggtagt	ggtcggcgag	ctgcacgctg	ccgtcctcga	4740
tgttggtggc	gatcttgaag	ttcaccttga	tgccgttctt	ctgcttgctg	gccatgatat	4800
agacgttggt	gctgtttag	ttgtactcca	gcttggtccc	caggatgttg	ccgtcctcct	4860
tgaagtcgat	gcccttcagc	tcgatgcggt	tcaccagggt	gtcgccctcg	aacttcacct	4920
cggcgcggtt	cttgtagttg	ccgtcgtcct	tgaagaagat	ggtgcgctcc	tggacgtagc	4980
cttcggggcat	ggcggacttg	aagaagtcgt	gctgcttcat	gtggtcgggg	ttgcggctga	5040
agcactgcac	gccgtaggtc	aggggtggtc	cgaggggtggg	ccagggcacg	ggcagcttgc	5100
cggtggtgca	gatgaacttc	agggtcagct	tgccgtaggt	ggcatcgccc	tcgccctcgc	5160
cggacacgct	gaacttgtgg	ccgtttacgt	cgccgtccag	ctcgaccagg	atgggcacca	5220
ccccggtgaa	cagctcctcg	cccttgcacc	atactagagt	ccgcaaaaat	caccagtctc	5280
tctctacaaa	tctatctctc	tctatttttc	tccagaataa	tgtgtgagta	gttcccagat	5340
aagggaatta	gggttcttat	agggtttcgc	tcattgtgtt	agcatataag	aaacccttag	5400
tatgtatttg	tatttgtaaa	atacttctat	caataaaatt	tctaattcct	aaaacaaaaa	5460
tccagtgacc	gggcggcggt	tcgagaatga	ttattttatg	aatatatttc	attgtgcaag	5520
tagatagaaa	ttacatatgt	tacataacac	acgaaataaa	caaaaaaaga	caatccaaaa	5580
acaaacaccc	caaaaaaat	aatcacttta	gataaactcg	tatgaggaga	ggcacgttca	5640
gtgactcgac	gattcccag	caaaaaaagt	ctccccgtca	cacatatagt	gggtgacgca	5700
attatcttta	aagtaatcct	tctgttgact	tgtcattgat	aacatccagt	cttcgtcagg	5760
attgcaaaga	attatagaag	ggatcccacc	ttttattttc	ttcttttttc	catatttagg	5820
gttgacagtg	aaatcagact	ggcaacctat	taattgcttc	cacaatggga	cgaacttgaa	5880
ggggatgtcg	tcgatgatat	tataggtggc	gtgttcacgc	tagttggtga	aatcgatggt	5940
accgttccaa	tagttgtgtc	gtccgagact	tctagcccag	gtggtctttc	cggtagcaggt	6000
tgggtccgag	atgtagaggc	tgggggtgtc	gattccattc	cttccattgt	cctgggttaa	6060
tcggccatcc	attcaagggt	agattgagct	tgttggtatg	agacaggatg	tatgtaagta	6120
taagcgtcta	tgcttacatg	gtatagatgg	gtttccctcc	aggagtgtag	atcttcgtgg	6180

cagcgaagat ctgattctgt gaagggcgac acatacgggt caggttgtgg agggaataat	6240
ttgttggtcg aatattccag ccattgaagt tttgttgccc attcatgagg gaattcttcc	6300
ttgatcatgt caagatattc ctccttagac gttgcagtcg ggataatagt tctccatcgt	6360
gcgtcagatt tgcgaggaga gaccttatga tctcggaaat ctcctctggt tttaatatct	6420
ccgtcctttg atatgtaatc aaggacttgt ttagagtttc tagctggctg gatattaggg	6480
tgatttcctt caaaatcgaa aaaagaagga tccctaatac aagggttttt atcaagctgg	6540
agaagagcat gatagtgggt agtgccatct tgatgaagct cagaagcaac accaaggaag	6600
aaaataagaa aagggtgtgag tttctcccag agaaactgga ataaatcatc tctttgagat	6660
gagcacttgg gataggtaag gaaaacatat ttagattgga gtctgaagtt cttactagca	6720
gaaggcatgt tgttgtgact ccgagggggt gcctcaaact ctatcttata accggcgtgg	6780
aggcatggag gcaggggtat tttggtcatt ttaatagata gtggaaaatg acgtggaatt	6840
tacttaaaga cgaagtcttt ggacaagggg gggccacgc cgaatttaat attaccggcg	6900
tggccccccc ttatcgcgag tgcttttagca cgagcgggtcc agatttaaag tagaaaattt	6960
cccgccact aggggttaaag gtgttcacac tatacaagca tatacagatgt gatggtattg	7020
actagagttt aaactatcag tgtttgacag gatataattg cgggtaaacc taagagaaaa	7080
gagcgtttat tagaataatc ggatatttaa aagggcgtga aaagggttat ccgttcgtcc	7140
atttgtatgt gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttcc gacgtcacc	7200
gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaa cgcgccagaa	7260
acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgg ccgccggcgt tgtggatacc tcgcggaaaa	7320
cttggccctc actgacagat gaggggcgga cgttgacact tgaggggccc actcaccggg	7380
cgcggcgttg acagatgagg ggcaggctcg atttcggccg gcgacgtgga gctggccagc	7440
ctcgcaaatc ggcgaaaacg cctgatttta cgcgagtttc ccacagatga tgtggacaag	7500
cctgggggata agtgccctgc ggtattgaca cttgaggggc gcgactactg acagatgagg	7560
ggcgcgatcc ttgacacttg aggggcagag tgctgacaga tgaggggcgc acctattgac	7620
atttgagggg ctgtccacag gcagaaaatc cagcatttgc aagggtttcc gcccgttttt	7680
cggccaccgc taacctgtct tttaacctgc ttttaaacca atatttataa accttgtttt	7740
taaccagggc tgcgccctgt gcgcgtgacc gcgcacgccg aaggggggtg ccccccttc	7800
tcgaaccctc ccggcccgct aacgcgggcc tcccatcccc ccaggggctg cgcccctcg	7860
ccgcgaacgg cctcacccca aaaatggcag cgctggcagt ccttgccatt gccgggatcg	7920
gggcagtaac gggatgggcg atcagcccga aagctacccc tatttgttta ttttctaaa	7980
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt	8040
gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc tttttgcgg	8100

cattttgcct	tcctgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	gaaagtaaaa	gatgctgaag	8160
atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	8220
agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaagtt	ctgctatgtg	8280
gcgcggtatt	atcccgatt	gacgccgggc	aagagcaact	cggtcgccgc	atacactatt	8340
ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	gcaccttacg	gatggcatga	8400
cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaaacttac	8460
ttctgacaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgacaaac	atgggggac	8520
atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	8580
gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaa	8640
tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	8700
gaccacttct	gcgctcggcc	cttcgggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	8760
gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgt	8820
tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	8880
ctgagatagg	tgcctcactg	attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	8940
tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	9000
ttgataatct	catgacaaaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	9060
ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	9120
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttggtt	gccggatcaa	gagctaccaa	9180
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gttcttctag	9240
tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	9300
tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcc	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	9360
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	9420
cacagcccag	cttgagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	9480
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	9540
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcttggtat	ctttatagtc	9600
ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	9660
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	9720
cttttgctca	catggactct	agctagagga	tcacaggcag	caacgctctg	tcacgtttac	9780
aatcaacatg	ctaccctccg	cgagatcatc	cgtgtttcaa	acccggcagc	ttagttgccg	9840
ttcttccgaa	tagcatcggt	aacatgagca	aagtctgccg	ccttacaacg	gctctcccgc	9900
tgacgccgct	ccggactgat	gggctgcctg	tatcgagtgg	tgattttgtg	ccgagctgcc	9960

ES 2 842 211 T3

ggtcggyggag ctgtttggctg gctggtggca ggatatattg tgggtgtaaac aaattgacgc 10020
 ttagacaact taataacaca ttgcggacgt ttttaatgat cgaataactaa cgtctctacc 10080
 acatt 10085

<210> 17
 <211> 10174
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pRIC3 mLuc SV40ori

<400> 17

gaagagcgtg actccgaggg gttgcctcaa actctatctt ataaccggcg tggaggcatg 60
 gaggcagggg tatttttggtc attttaatag atagtggaaa atgacgtgga atttacttaa 120
 agacgaagtc tttgcgacaa gggggggccc acgccgaatt taatattacc ggcgtggccc 180
 ccccttatcg cgagtgcctt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa atttcccgcc 240
 cactaggggt aaaggtgttc aactataaaa agcatatacg atgtgatggt atttggtcga 300
 cacgcgtcac gtgagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctcaactact 360
 ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa aaattagtca 420
 gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag 480
 gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcttgctt tgcatacttc tgccctgctgg 540
 ggagcctggg gactttccac acctgggtgc tgactaattg agatgcttgc tttgcatact 600
 tctgcctgcc tggggagcct ggggactttc cacaccgtcg acggatcctt atcgatttta 660
 ccacatttgt agaggtttta ctgtctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga 720
 aacataaaat gaatgcaatt gttgttggtt acttgtttat tgcagcttat aatggttaca 780
 aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt 840
 gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg ttaattaatt acacggcgat 900
 ctttccgccc ttcttggcct ttatgaggat ctctctgatt tttcttgcgt cgagttttcc 960
 ggtaagacct ttcggtactt cgtccacaaa cacaactcct ccgcgcaact ttttcgcggt 1020
 tgttacttga ctggcgacgt aatccacgat ctctttttcc gtcacgtctt ttccgtgctc 1080
 caaaacaaca acggcggcgg gaagttcacc ggcgtcatcg tcgggaagac ctgcgacacc 1140
 tgcgtcgaag atgttggggg gttggagcaa gatggattcc aattcagcgg gagccacctg 1200
 atagcctttg tacttaaatca gagacttcag gcggtcaacg atgaagaagt gttcgtcttc 1260
 gtcccagtaa gctatgtctc cagaatgtag ccatccatcc ttgtcaatca aggcgttggt 1320
 cgcttccgga ttgtttacat aaccggacat aatcatagga cctctcacac acagttcgcc 1380
 tctttgatta acgcccagcg ttttcccggt atccagatcc acaaccttcg cttcaaaaaa 1440

tggaacaact ttaccgaccg cgcccgggtt atcatcccc tcgggtgtaa tcagaatagc	1500
tgatgtagtc tcagtga gcc catatccttg cctgatacct ggcagatgga acctcttgcc	1560
aaccgcttcc ccgacttcct tagagagggg agcgccacca gaagcaattt cgtgtaaatt	1620
agataaatcg tatttgtcaa tcagagtgtc tttggcgaag aaggagaata gggttggcac	1680
cagcagcgca ctttgaatct tgtaatcctg aaggctcctc agaaacagct cttcttcaaa	1740
tctatacatt aagacgactc gaaatccaca tatcaaatat ccgagtgtag taaacattcc	1800
aaaaccgtga tggaatggaa caacacttaa aatcgagta tccggaatga tttgattgcc	1860
aaaaatagga tctctggcat gcgagaatct cagcaggca gttctatgag gcagagcgac	1920
acctttaggc agaccagtag atccagagga gttcatgac agtgcaattg tcttgtccct	1980
atcgaaggac tctggcacia aatcgtattc attaaaaccg ggaggtagat gagatgtgac	2040
gaacgtgtac atcgactgaa atccctggta atccgtttta gaatccatga taataatttt	2100
ttggatgatt gggagctttt tttgcacgtt caaaattttt tgcaaccctt ttttggaaac	2160
gaacaccacg gtaggctgcg aaatgcccac actggtgagc aattcacgtt cattataaat	2220
gtcgttcgcg ggcgcaactg caactccgat aaataacgcg cccaacaccg gcataaagaa	2280
ttgaagagag ttttcaactgc atacgacgat tctgtgattt gtattcagcc catatcgttt	2340
catagcttct gccaaaccgaa cggacatttc gaagtactca gcgtaagtga tgtccacctc	2400
gatatgtgca tctgtaaaag caattgttcc aggaaccagg gcgtatctct tcatagcctt	2460
atgcagttgc tctccagcgg tcccatcttc cagcggatag aatggcgccg ggcctttctt	2520
tatgtttttg gcgtcttcca taagcttact tagatcgag atccagcaca atggatctgg	2580
aggctcaggg atctctagag aattcctcac gacacctgaa atggaagaaa aaaactttga	2640
accactgtct gaggcttgag aatgaaccaa gatccaaact caaaaagggc aaattccaag	2700
gagaattaca tcaagtgcc agctggccta acttcagtct ccaccactc agtgtgggga	2760
aactccatcg cataaaaccc ctccccccaa cctaaagacg acgtactcca aaagctcgag	2820
aactaatcga ggtgcctgga cggcgccccg tactccgtgg agtcacatga agcgacggct	2880
gaggacggaa aggccctttt cctttgtgtg ggtgactcac ccgcccgtc tcccgagcgc	2940
cgcgtcctcc attttgagct ccctgcagca gggccgggaa gcggccatct ttccgctcac	3000
gcaactggtg ccgaccgggc cagccttgcc gccagggcg gggcgatata cggcggcgcg	3060
aggccaggca ccagagcagg ccggccagct tgagactacc ccgctccgat tctcgggtggc	3120
cgcgctcgca ggccccgcct cgccgaacat gtgcgctggg acgcacgggc ccgctcgccg	3180
cccgcggccc caaaaaccga aataccagtg tgcagatctt ggcccgcat tacaagacta	3240
tcttgccaga aaaaagcgt cgcagcaggt catcaaaaat tttaaatggc tagagactta	3300

tcgaaagcag	cgagacaggc	gcgaaggtgc	caccagattc	gcacgcggcg	gccccagcgc	3360
ccaggccagg	cctcaactca	agcacgaggc	gaaggggctc	cttaagcgca	aggcctcgaa	3420
ctctcccacc	cacttccaac	ccgaagctcg	ggatcaagaa	tcacgtactg	cagccagggtg	3480
gaagtaattc	aaggcacgca	agggccataa	cccgtaaaga	ggccaggccc	gcgggaacca	3540
cacacggcac	ttacctgtgt	tctggcggca	aacccgttgc	gaaaaagaac	gttcacggcg	3600
actactgcac	ttatatacgg	ttctccccc	ccctcgggaa	aaaggcggag	ccagtacacg	3660
acatcacttt	cccagtttac	cccgcgccac	cttctctagg	caccggttca	attgccgacc	3720
cctcccccca	acttctcggg	gactgtgggc	gatgtgcgct	ctgcccactg	acgggcaccg	3780
gagccaattc	ccagtcgacc	tgggtccaaag	accagagggc	tattgagact	tttcaacaaa	3840
gggtaatatc	gggaaacctc	ctcggattcc	attgcccagc	tatctgtcac	ttcatcgaaa	3900
ggacagtaga	aaaggaagat	ggcttctaca	aatgccatca	ttgcgataaa	ggaaaggcta	3960
tcgttcaaga	tgctcttacc	gacagtggtc	ccaagatgg	acccccaccc	acgaggaaca	4020
tcgtggaaaa	agaagacgtt	ccaaccacgt	cttcaaagca	agtggattga	tgtgatacat	4080
gggtggagcac	gacactctcg	tctactccaa	gaatatcaaa	gatacagtct	cagaagacca	4140
gagggctatt	gagacttttc	aacaaaggg	aatatcggga	aacctcctcg	gattccattg	4200
cccagctatc	tgtcacttca	tcgaaaggac	agtagaaaag	gaagatggct	tctacaaatg	4260
ccatcattgc	gataaaggaa	aggctatcgt	tcaagatgcc	tctaccgaca	gtgggtcccaa	4320
agatggaccc	cccccacga	ggaacatcgt	ggaaaaagaa	gacgttccaa	ccacgtcttc	4380
aaagcaagtg	gattgatgtg	atatctccac	tgacgttaagg	gatgacgcac	aatcccacta	4440
tccttcgcaa	gacccttcct	ctatataagg	aagttcattt	catttggaga	ggacacgctg	4500
agttcacaac	acaaatcaga	tttatagaga	gatttataaa	aaaaaaaaaa	catgtgatcc	4560
cgggaattcg	ctagcactag	agtgtgatcc	cgggaattcg	ctagcactag	agtcgcggcc	4620
gctttacttg	tacagctcgt	ccatgccgag	agtgatcccg	gcggcgggtca	cgaactccag	4680
caggaccatg	tgatcgcgct	tctcgttggg	gtctttgctc	agggcggact	gggtgctcag	4740
gtagtggttg	tcgggcagca	gcacggggcc	gtcgcgatg	gggatgttct	gctggtagtg	4800
gtcggcgagc	tgacgcgtgc	cgtcctcgat	gttgtggcgg	atcttgaagt	tcaccttgat	4860
gccgttcttc	tgcttgctcg	ccatgatata	gacgttgtgg	ctgttgtagt	tgtactccag	4920
cttgtagccc	aggatgttgc	cgtcctcctt	gaagtcgatg	cccttcagct	cgatgcgggtt	4980
caccaggggtg	tcgccctcga	acttcacctc	ggcgcgggtc	ttgtagttgc	cgtcgtcctt	5040
gaagaagatg	gtgcgctcct	ggacgtagcc	ttcgggcatg	gcggacttga	agaagtcgtg	5100
ctgcttcatg	tggtcgggg	tgcggtgaa	gcactgcacg	ccgtaggtca	gggtggtcac	5160
gaggggtgggc	cagggcacgg	gcagcttgcc	ggtggtgcag	atgaacttca	gggtcagctt	5220

gccgtaggtg gcatcgccct cgccctcgcc ggacacgctg aacttggtggc cgtttacgtc	5280
gccgtccagc tcgaccagga tgggcaccac cccggtgaac agctcctcgc ccttgcacca	5340
tactagagtc cgcaaaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctct ctatctctct	5400
ccagaataat gtgtgagtag ttcccagata agggaattag ggttcttata gggtttcgct	5460
catgtgttga gcatataaga aacccttagt atgtatttgt atttgtaaaa tacttctatc	5520
aataaaatct ctaattccta aaaccaaaat ccagtgaccg ggcgggcggt cgagaatgat	5580
tattttatga atatatttca ttgtgcaagt agatagaaat tacatatgtt acataacaca	5640
cgaaataaac aaaaaaagac aatccaaaaa caaacacccc aaaaaaata atcactttag	5700
ataaaactcgt atgaggagag gcacgttcag tgactcgacg attcccgagc aaaaaaagtc	5760
tccccgtcac acatatagtg ggtgacgcaa ttatctttta agtaatcctt ctgttgactt	5820
gtcattgata acatccagtc ttcgtcagga ttgcaaagaa ttatagaagg gatcccacct	5880
tttattttct tcttttttcc atatttaggg ttgacagtga aatcagactg gcaacctatt	5940
aattgcttcc acaatgggac gaacttgaag gggatgtcgt cgatgatatt ataggtggcg	6000
tgttcatcgt agttggtgaa atcgatggta ccgttccaat agttgtgtcg tccgagactt	6060
ctagcccagg tggcttttcc ggtacgagtt ggtccgcaga tgtagaggct ggggtgtcgg	6120
attccattcc ttccattgtc ctgggttaa atcgccatcca ttcaagggtca gattgagctt	6180
gttggtatga gacaggatgt atgtaagtat aagcgtctat gcttacatgg tatagatggg	6240
tttccctcca ggagtgtaga tcttcgtggc agcgaagatc tgattctgtg aagggcgaca	6300
catacggttc aggttgtgga gggaataatt tggtggctga atattccagc cattgaagtt	6360
ttgttgcca ttcatgaggg aattcttctt tgatcatgtc aagatattcc tcttagacg	6420
ttgcagtctg gataatagtt ctccatcgtg cgtcagattt gcgaggagag accttatgat	6480
ctcggaatc tcctctggtt ttaatatctc cgtcctttga tatgtaatca aggacttggt	6540
tagagtttct agctggctgg atattagggt gatttccttc aaaatcgaaa aaagaaggat	6600
ccctaataca aggtttttta tcaagctgga gaagagcatg atagtgggtg gtgccatctt	6660
gatgaagctc agaagcaaca ccaaggaaga aaataagaaa aggtgtgagt ttctcccaga	6720
gaaactggaa taaatcatct ctttgagatg agcacttggg ataggtaagg aaaacatatt	6780
tagattggag tctgaagttc ttactagcag aaggcatgtt gttgtgactc cgaggggttg	6840
cctcaaactc tatcttataa ccggcgtgga ggcattggagg caggggtatt ttggtcattt	6900
taatagatag tggaaaatga cgtggaattt acttaaagac gaagtctttg gacaaggggg	6960
ggcccacgcc gaatttaata ttaccggcgt gggccccctt tatcgcgagt gctttagcac	7020
gagcgttcca gattttaaagt agaaaatttc ccgcccacta ggggttaaagg tggtcacact	7080

atacaagcat	atacgatgtg	atggtattga	ctagagttta	aactatcagt	gtttgacagg	7140
atatattggc	gggtaaacct	aagagaaaag	agcgtttatt	agaataatcg	gatattttaa	7200
agggcgtgaa	aagggtttatc	cgttcgtcca	tttgtatgtg	tacatcaccg	acgagcaagg	7260
caagaccgag	cgcctttccg	acgctcaccg	ggctggttgc	cctcgccgct	gggctggcgg	7320
ccgtctatgg	ccctgcaaac	gcgccagaaa	cgccgtcgaa	gccgtgtgcg	agacaccggc	7380
cgccggcggt	gtggatacct	cgcggaaaac	ttggccctca	ctgacagatg	agggggcggac	7440
gttgacactt	gaggggcccga	ctcaccocgg	gcggcggtga	cagatgaggg	gcaggctcga	7500
tttcggcccg	cgacgtggag	ctggccagcc	tcgcaaatac	gcgaaaacgc	ctgattttac	7560
gcgagtttcc	cacagatgat	gtggacaagc	ctggggataa	gtgccctgcg	gtattgacac	7620
ttgaggggcg	cgactactga	cagatgaggg	gcgcgatcct	tgacacttga	ggggcagagt	7680
gctgacagat	gaggggcccga	cctattgaca	tttgaggggc	tgtccacagg	cagaaaatcc	7740
agcatttgca	aggggtttccg	cccgtttttc	ggccaccgct	aacctgtctt	ttaacctgct	7800
tttaaaccaa	tatttataaa	ccttggtttt	aaccagggct	gcgccctgtg	cgcgtgaccg	7860
cgcacgccga	aggggggtgc	cccccttct	cgaacctctc	cggcccgcga	acgcgggcct	7920
cccatcccc	caggggctgc	gcccctcgcc	cgcgaacggc	ctcaccocaa	aaatggcagc	7980
gctggcagtc	cttgccattg	ccgggatcgg	ggcagtaacg	ggatgggcga	tcagcccga	8040
agctaccocct	atttgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	tcattgagaca	8100
ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	8160
ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgccgc	attttgccct	cctgtttttg	ctcaccocaga	8220
aacgctggtg	aaagtaaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	8280
actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	8340
gatgagcact	tttaaagttc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtattg	acgccgggca	8400
agagcaactc	ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	8460
cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	8520
catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcgaggagc	cgaaggagct	8580
aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	8640
gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	8700
aacgttgccg	aaactattaa	ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	8760
agactggatg	gagggcgata	aagttgcagg	accacttctg	cgcctcgccc	ttccggctgg	8820
ctggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggtg	tcattgcagc	8880
actggggcca	gatggtaagc	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	8940
aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	9000

gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gattttaaacc ttcattttta 9060
 attttaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg 9120
 tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 9180
 tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg 9240
 ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 9300
 agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 9360
 ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatactg ttaccagtgg ctgctgccag 9420
 tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 9480
 gcggtcgggc tgaacggggg gtctgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 9540
 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa 9600
 ggcggacagg tatccggtta gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 9660
 agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 9720
 tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 9780
 ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc ttttgctcac atggactcta gctagaggat 9840
 cacaggcagc aacgctctgt catcggtaca atcaacatgc taccctccgc gagatcatcc 9900
 gtgtttcaaa cccggcagct tagttgccgt tcttccgaat agcatcggta acatgagcaa 9960
 agtctgccgc cttacaacgg ctctcccgt gacgccgtcc cggactgatg ggctgcctgt 10020
 atcgagtggg gattttgtgc cgagctgccg gtcggggagc tgttggctgg ctgggtggcag 10080
 gatataattgt ggtgtaaaca aattgacgct tagacaactt aataacacat tgcggacggt 10140
 tttaatgatc gaatactaac gtctctacca catt 10174

<210> 18
 <211> 255
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SV40 origen de replicación

<400> 18

cacgcgtcac gtgagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctactactt 60
 ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa aaattagtca 120
 gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag 180
 gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcttgctt tgcatacttc tgctgctgg 240
 ggagcctggg gactt 255

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un pseudovirión del virus del papiloma humano (VPH) en una célula vegetal, comprendiendo el método las etapas de:

(i) introducir en la célula vegetal:

(a) un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido L1 del VPH; y

(b) un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido L2 del VPH,

en el que el primer y segundo ácidos nucleicos están contenidos en al menos un vector de expresión,

(c) un vector de replicación derivado de un geminivirus que comprende una secuencia de origen de replicación (Ori) reconocida por una proteína asociada a replicación viral (Rep), el vector de replicación comprende además un tercer ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo, en el que el vector de replicación es capaz de experimentar la replicación del círculo rodante, y

(d) un cuarto ácido nucleico que codifica una proteína Rep,

en el que la replicación del vector replicante es iniciada por la proteína Rep, y

en el que el tercer ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia reguladora que permite la expresión del polipéptido heterólogo en una célula de mamífero;

(ii) expresar el polipéptido L1 del VPH y el polipéptido L2 del VPH y la proteína Rep en la célula vegetal, y

(iii) replicar el vector de replicación de la secuencia de Ori reconocida por la proteína Rep en la célula vegetal, para producir un alto número de copias de un pseudogenoma, en el que el pseudogenoma es más pequeño que el vector de replicación, es replicacionalmente inerte en células de mamífero en la ausencia de la proteína Rep, y comprende el tercer ácido nucleico,

en el que los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH expresados se ensamblan, junto con una copia del pseudogenoma y encapsulan el pseudogenoma para producir un pseudovirión del VPH.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el primer y segundo ácidos nucleicos están operativamente unidos a secuencias reguladoras que permiten la expresión de los polipéptidos L1 del VPH y L2 del VPH.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína Rep se expresa a partir de al menos uno del grupo seleccionado entre:

(i) una secuencia de ácido nucleico contenida en el vector de replicación;

(ii) una secuencia de ácido nucleico contenida en al menos un vector de expresión;

(iii) una secuencia de ácido nucleico contenida en un vector independiente, que no es el vector de (i) o (ii) anteriores; o

(iv) una secuencia de ácido nucleico integrada en el ADN genómico de la célula vegetal;

en el que la expresión de la proteína Rep en presencia del vector replicante da como resultado la replicación del vector replicante para producir un número elevado de copias del pseudogenoma en la célula vegetal.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tercer ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, comprende un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen informador, un gen terapéutico o un gen que codifica un polipéptido antigénico.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el gen que codifica un polipéptido heterólogo es un gen informador seleccionado de un gen de luciferasa o un gen de fosfatasa alcalina secretada.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una etapa de recuperar el pseudovirión del VPH de la célula vegetal.

7. Un ensayo para detectar la presencia de un anticuerpo neutralizante del VPH en un sujeto, incluyendo el ensayo las etapas de:

(i) combinar un pseudovirión del VPH producido de acuerdo con el método de la invención, con una muestra biológica del sujeto para formar una composición de la muestra biológica, en la que el polipéptido heterólogo es un polipéptido informador; y

(ii) combinar un pseudovirión del VPH producido de acuerdo con el método de la invención, con una muestra biológica de control, en la que la muestra biológica de control no contiene un anticuerpo neutralizante del VPH, para formar una composición de muestra de control, en la que el polipéptido heterólogo es un polipéptido informador;

(iii) poner en contacto e incubar una célula de mamífero capaz de infectarse con VPH con la composición de la muestra biológica de (i) o la composición de muestra de control de (ii); y

(iv) ensayar la expresión del polipéptido informador;

en el que la disminución de la expresión del polipéptido informador en las células de mamífero en contacto con la composición de la muestra biológica, en comparación con las células de mamífero en contacto con la composición de la muestra de control, es indicativa de la presencia de un anticuerpo neutralizante del VPH en la muestra biológica.

- 5 8. El ensayo de la reivindicación 7, en el que el polipéptido informador se selecciona entre un polipéptido luciferasa o fosfatasa alcalina secretada.
9. El ensayo de la reivindicación 7 u 8, en el que el sujeto es un ser humano.
- 10 10. Un pseudovirión del VPH producido de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el pseudovirión del VPH una cápside, donde en la que la cápside comprende los polipéptidos de L1 del VPH y L2 del VPH, en la que la cápside encapsula el pseudogenoma que comprende el tercer ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, en el que el tercer ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia reguladora que permite la expresión del polipéptido heterólogo en una célula de mamífero, en el que la replicación del vector de replicación se inicia a partir de la secuencia Ori reconocida por la proteína Rep, y en el que el pseudovirión del VPH se produce y se recupera de la célula vegetal.
- 15 11. El pseudovirión del VPH de la reivindicación 10, en el que la replicación del pseudogenoma puede iniciarse, en una célula de mamífero infectada por el pseudovirión del VPH en presencia de una proteína Rep, en la que la proteína Rep está codificada por una secuencia de ácido nucleico operativamente unida a una secuencia reguladora que permite la expresión de la proteína reguladora en la célula de mamífero, en la que la proteína Rep puede expresarse a partir de uno cualquiera del grupo que consiste en:
 - 20 (i) una secuencia de ácido nucleico contenida en el pseudogenoma;
 - 25 (ii) una secuencia de ácido nucleico contenida en un vector independiente; o
 - (iii) una secuencia de ácido nucleico integrada en el ADN genómico de la célula de mamífero,en el que la expresión de la proteína Rep en la célula de mamífero da como resultado la replicación del pseudogenoma.
- 30 12. El pseudovirión del VPH de la reivindicación 10, en el que el polipéptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido informador, un polipéptido terapéutico o un polipéptido antigénico.
- 35 13. Una composición farmacéutica que comprende un pseudovirión del VPH producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el pseudovirión del VPH de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

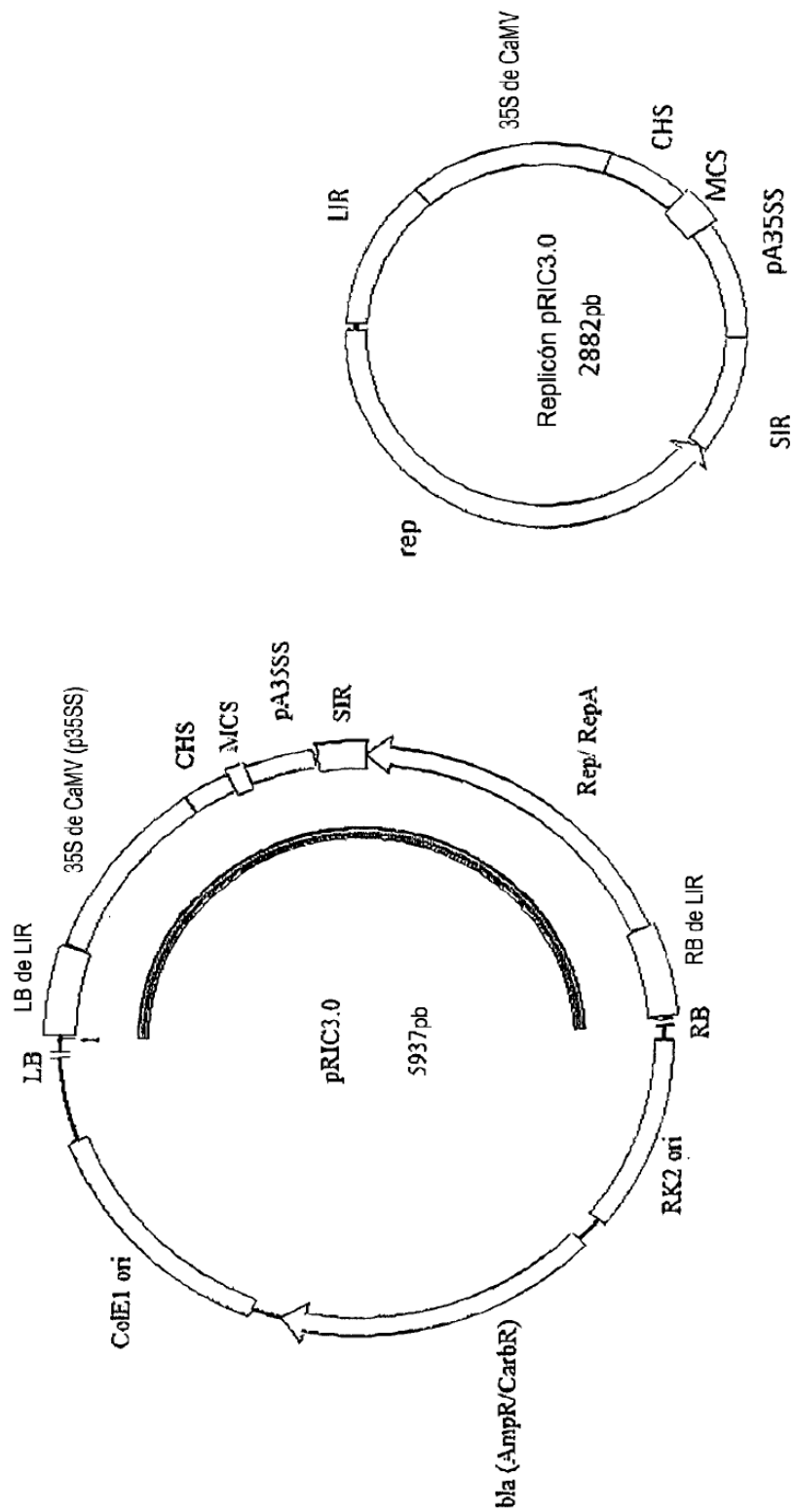


FIGURA 1

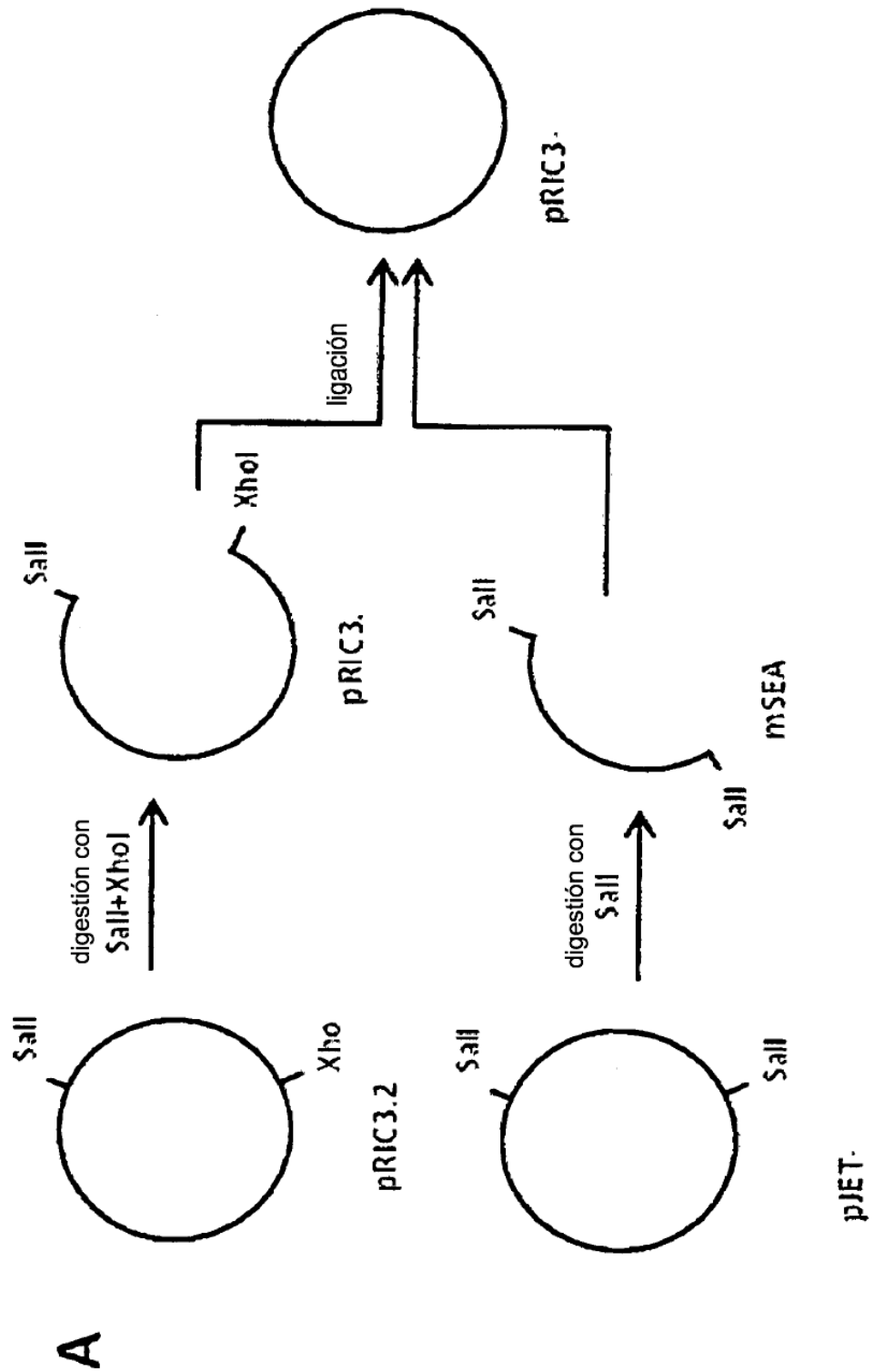


FIGURA 2

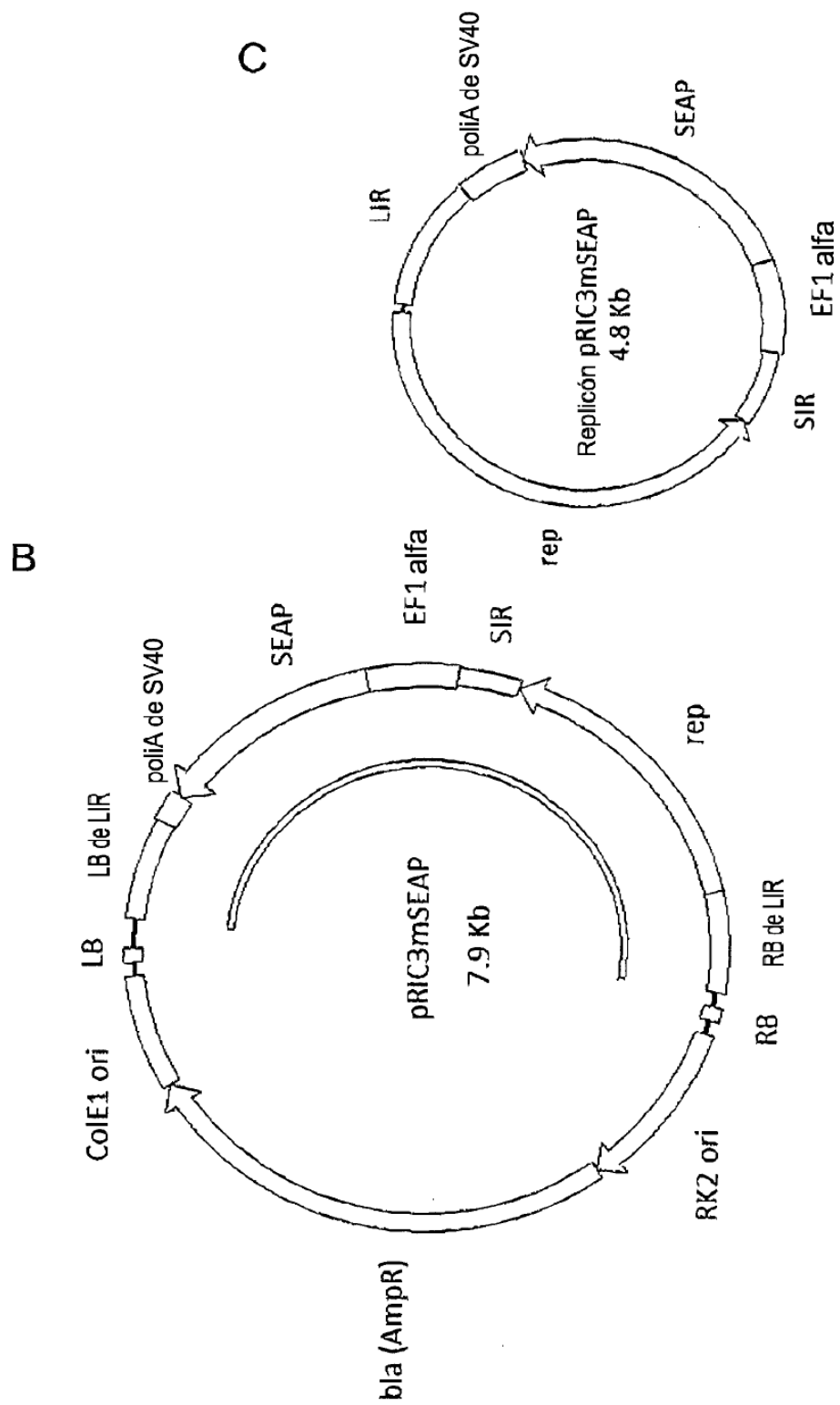


FIGURA 2 CONT

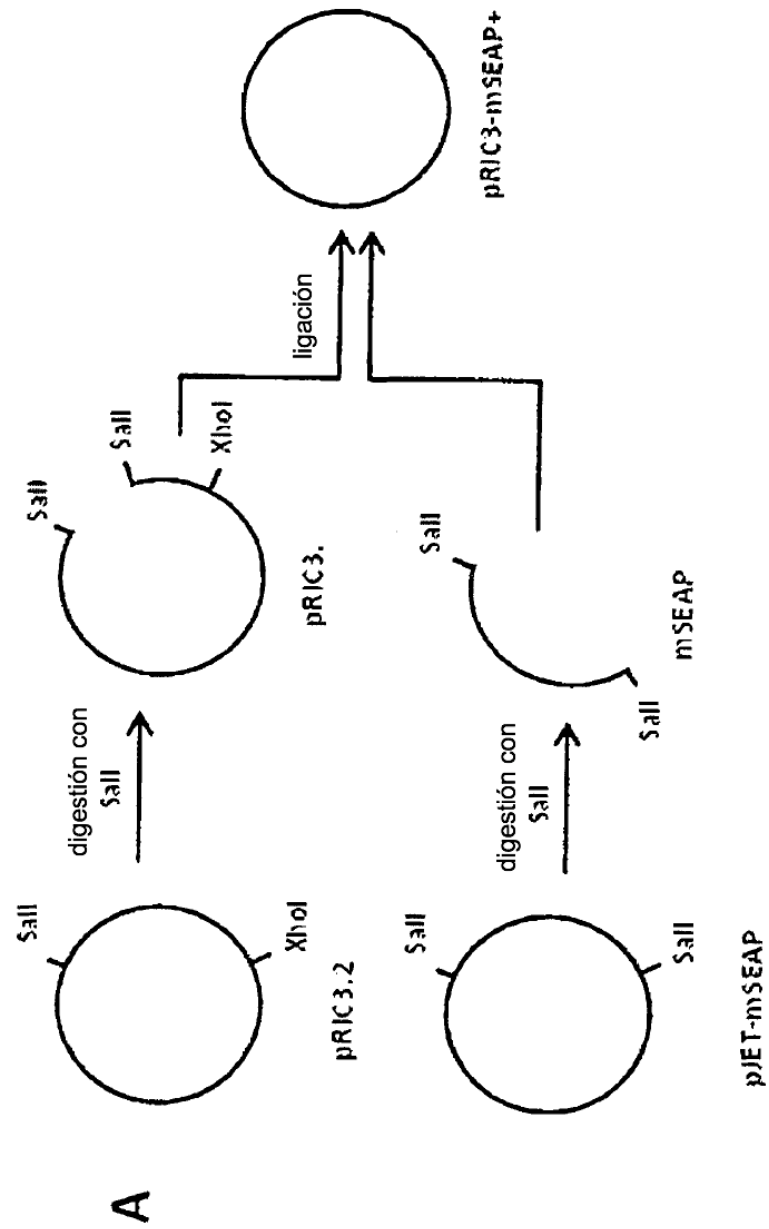
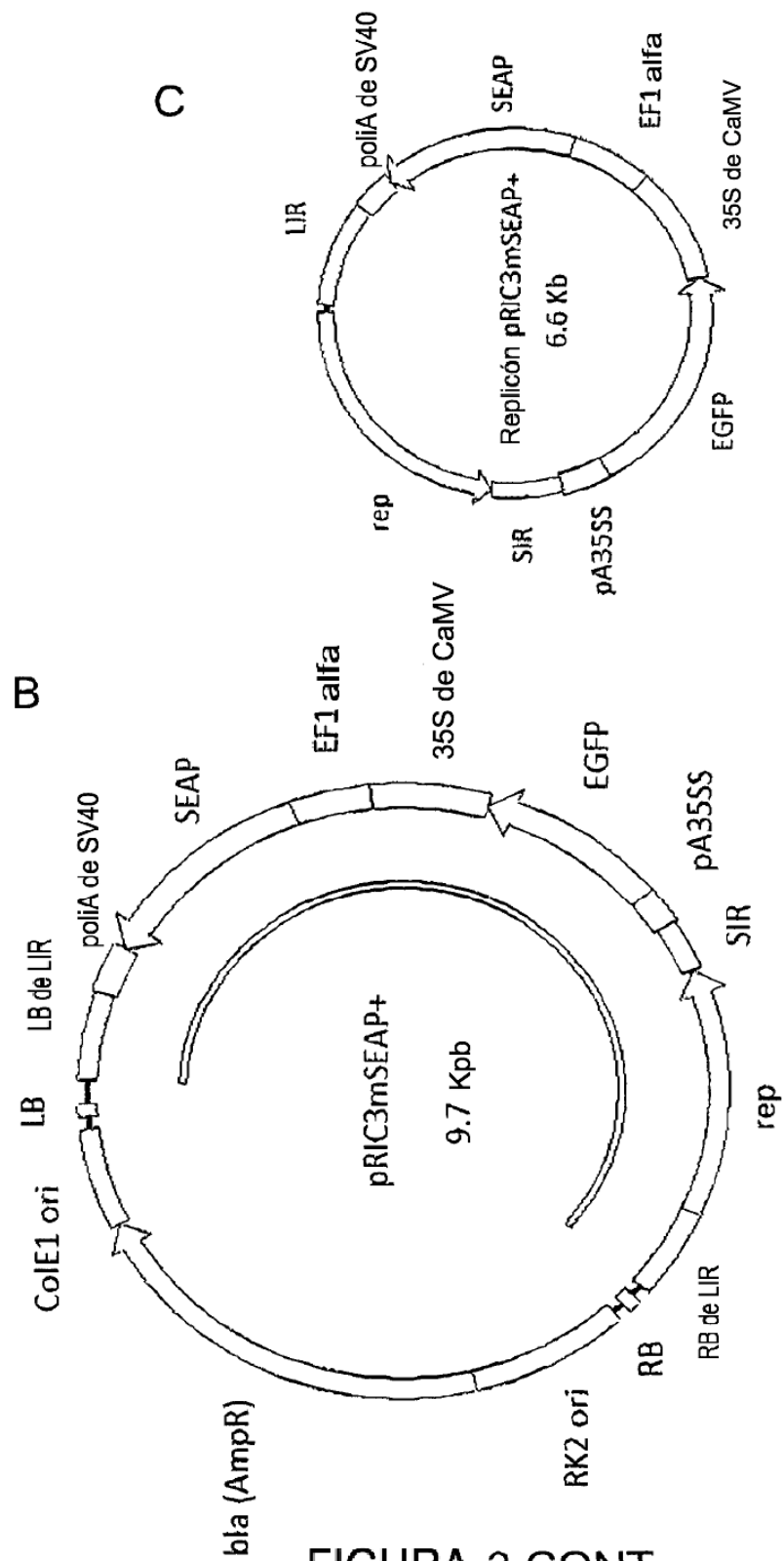
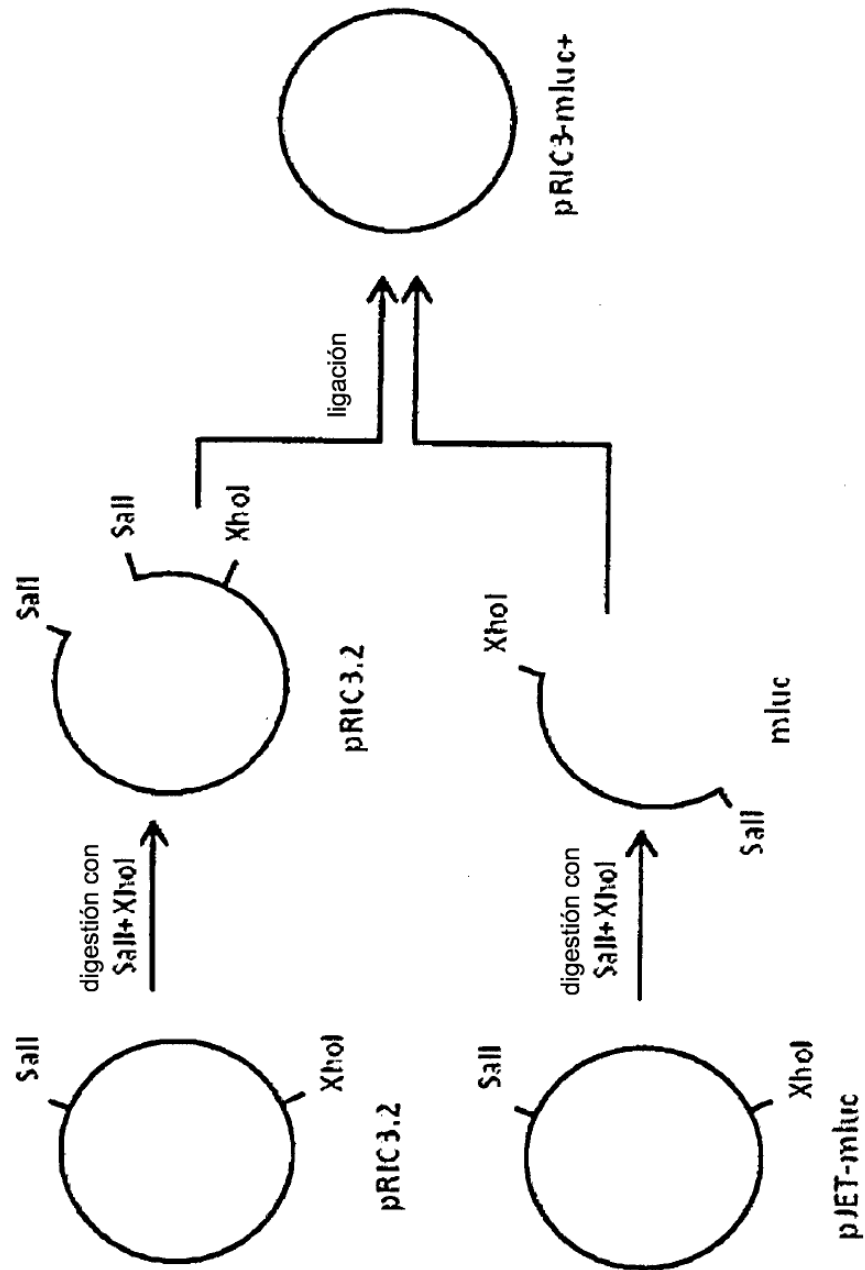


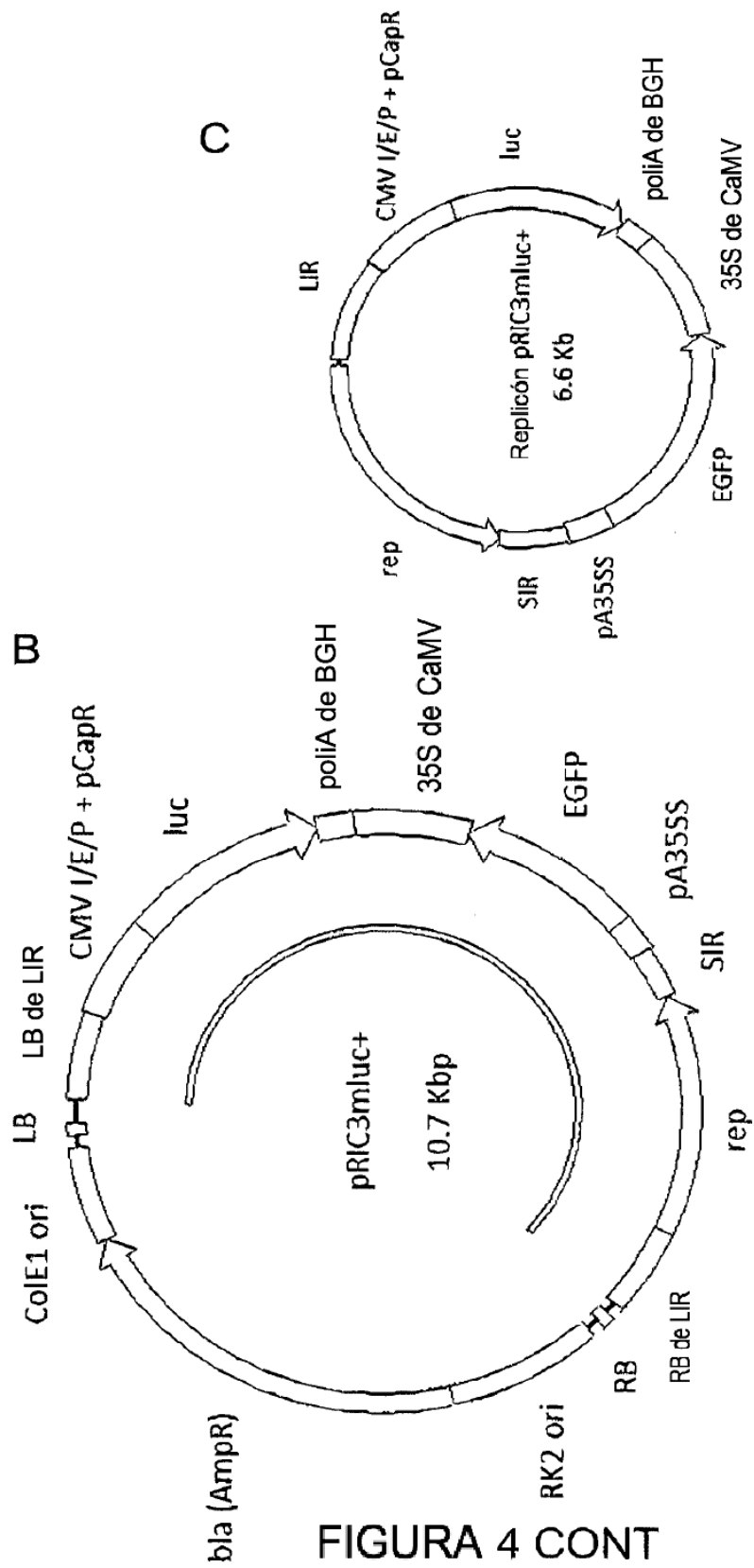
FIGURA 3





A

FIGURA 4



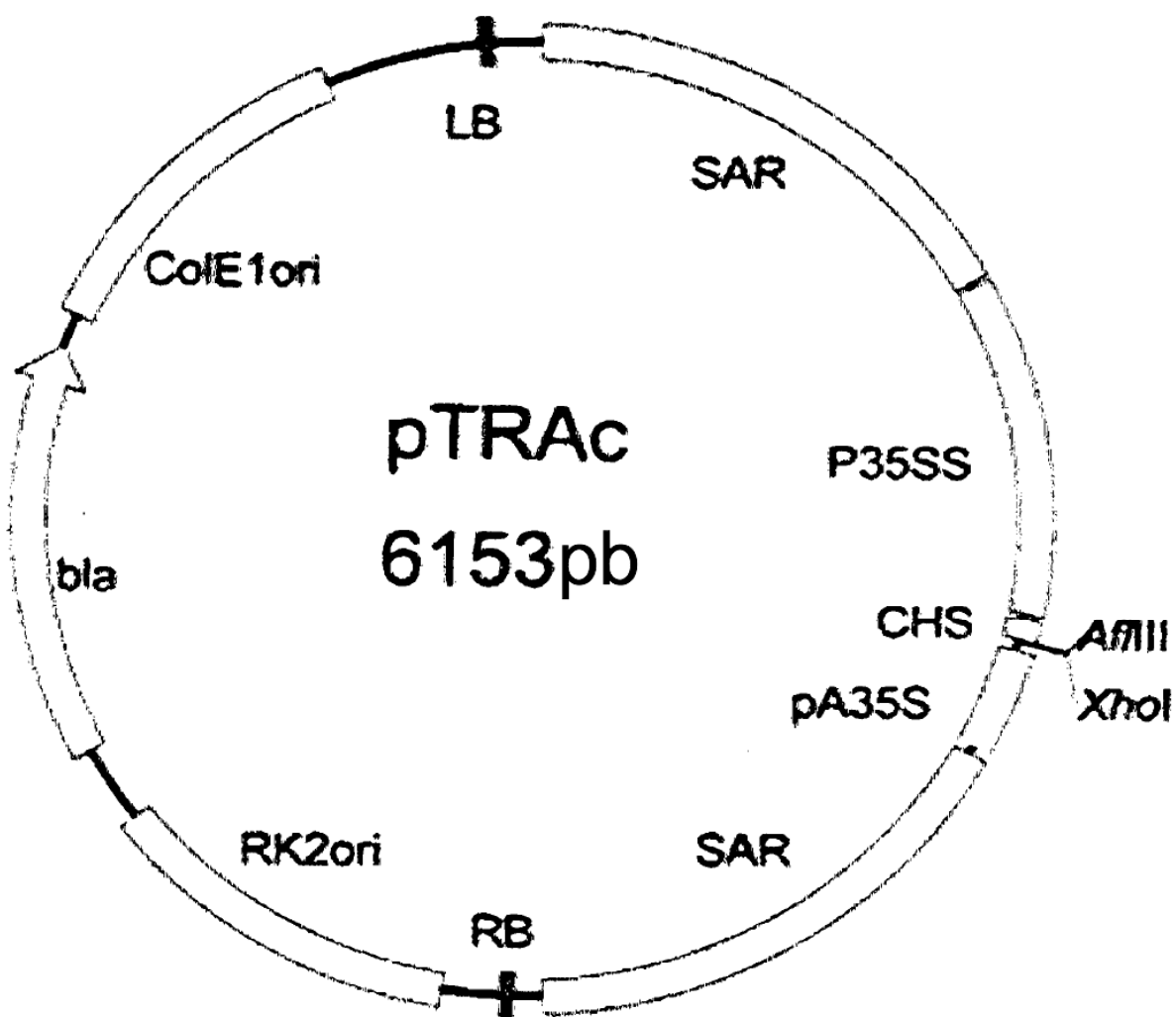


FIGURA 5

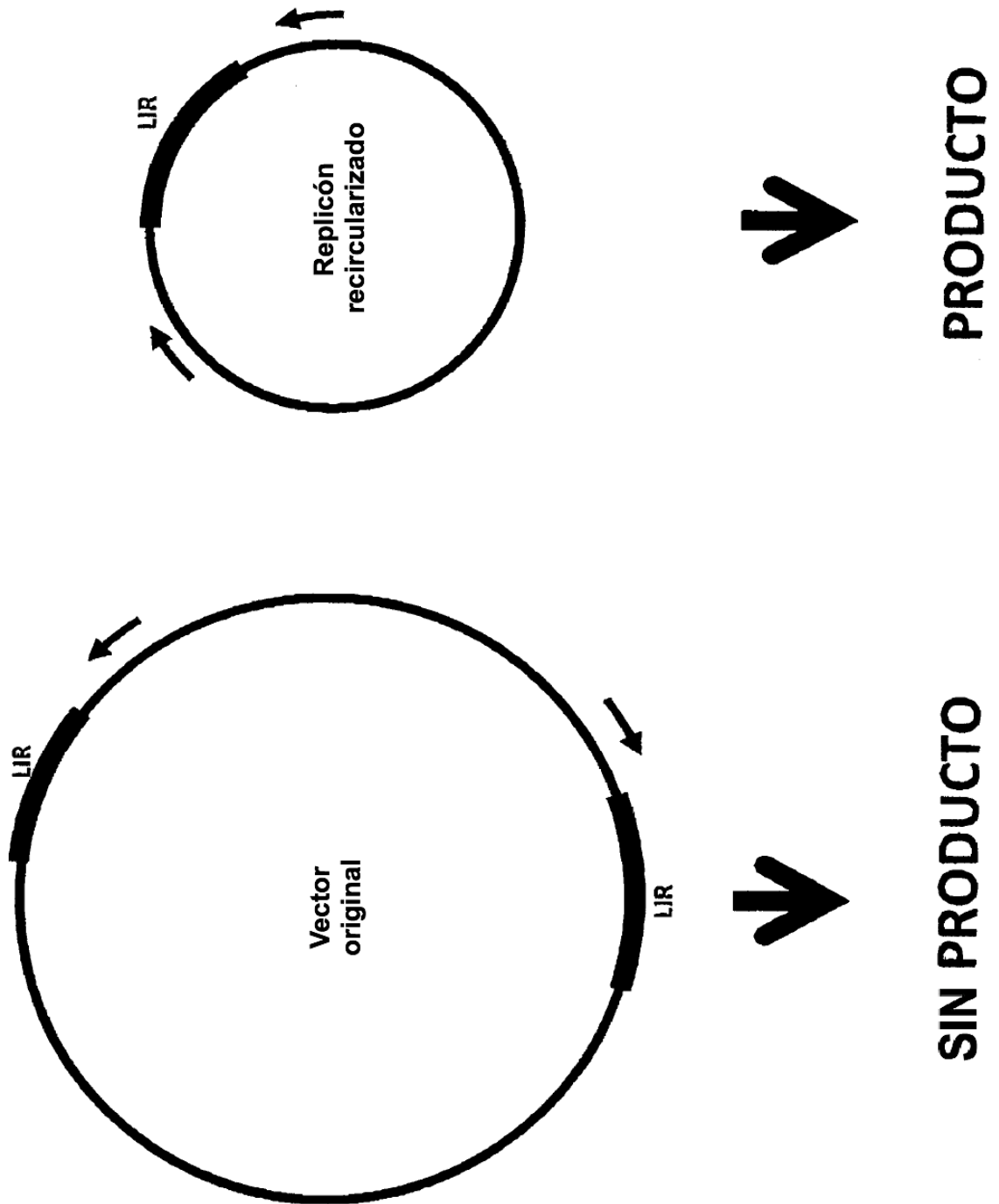
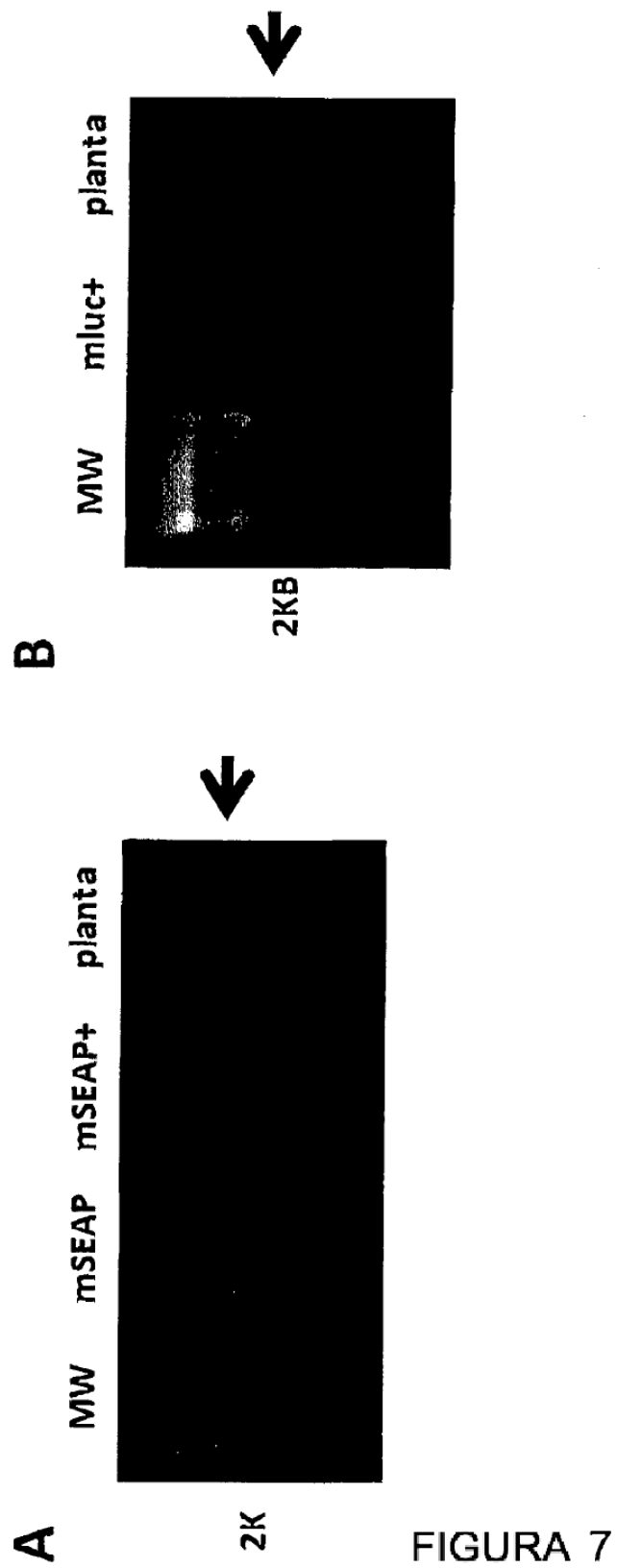


FIGURA 6



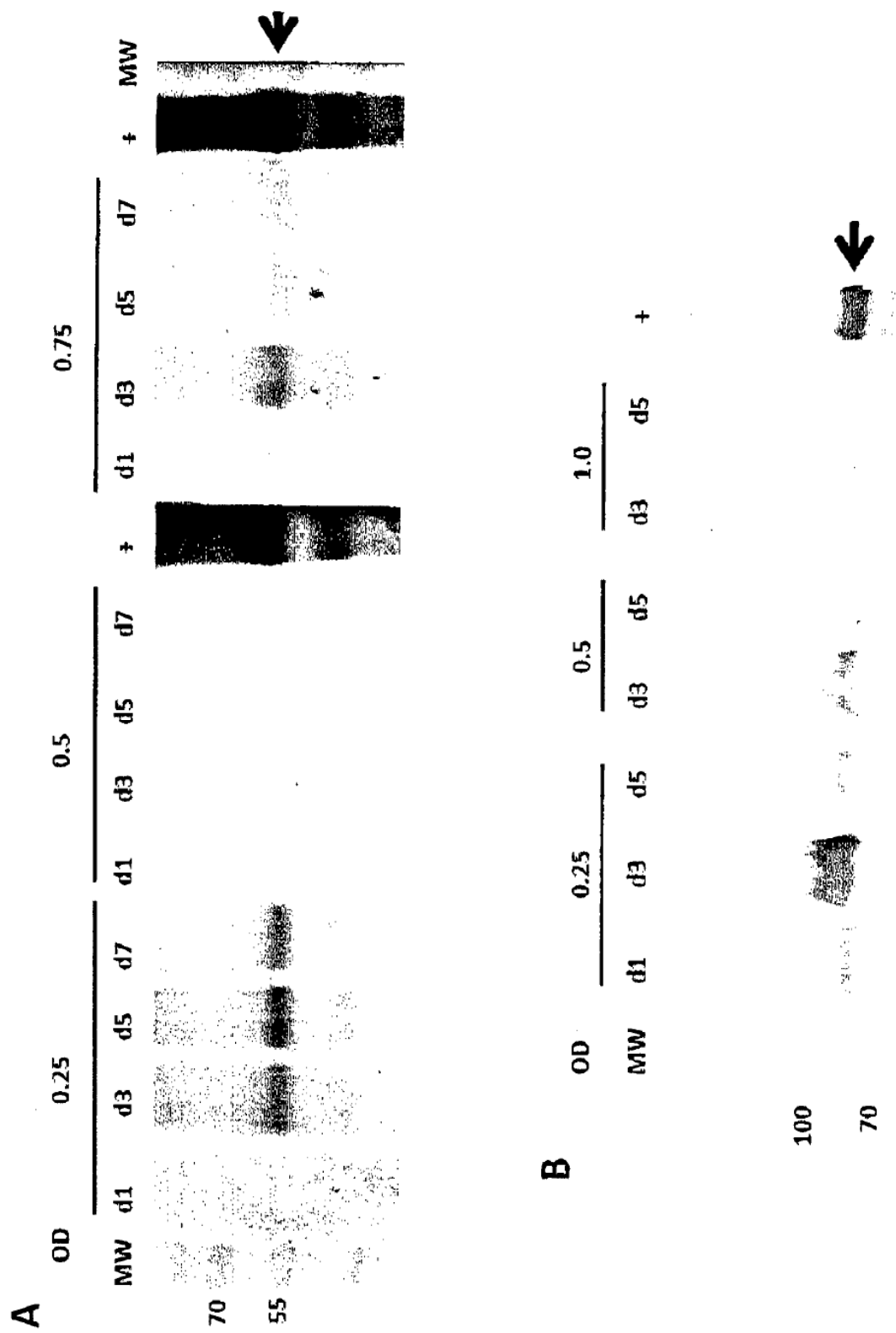


FIGURA 8

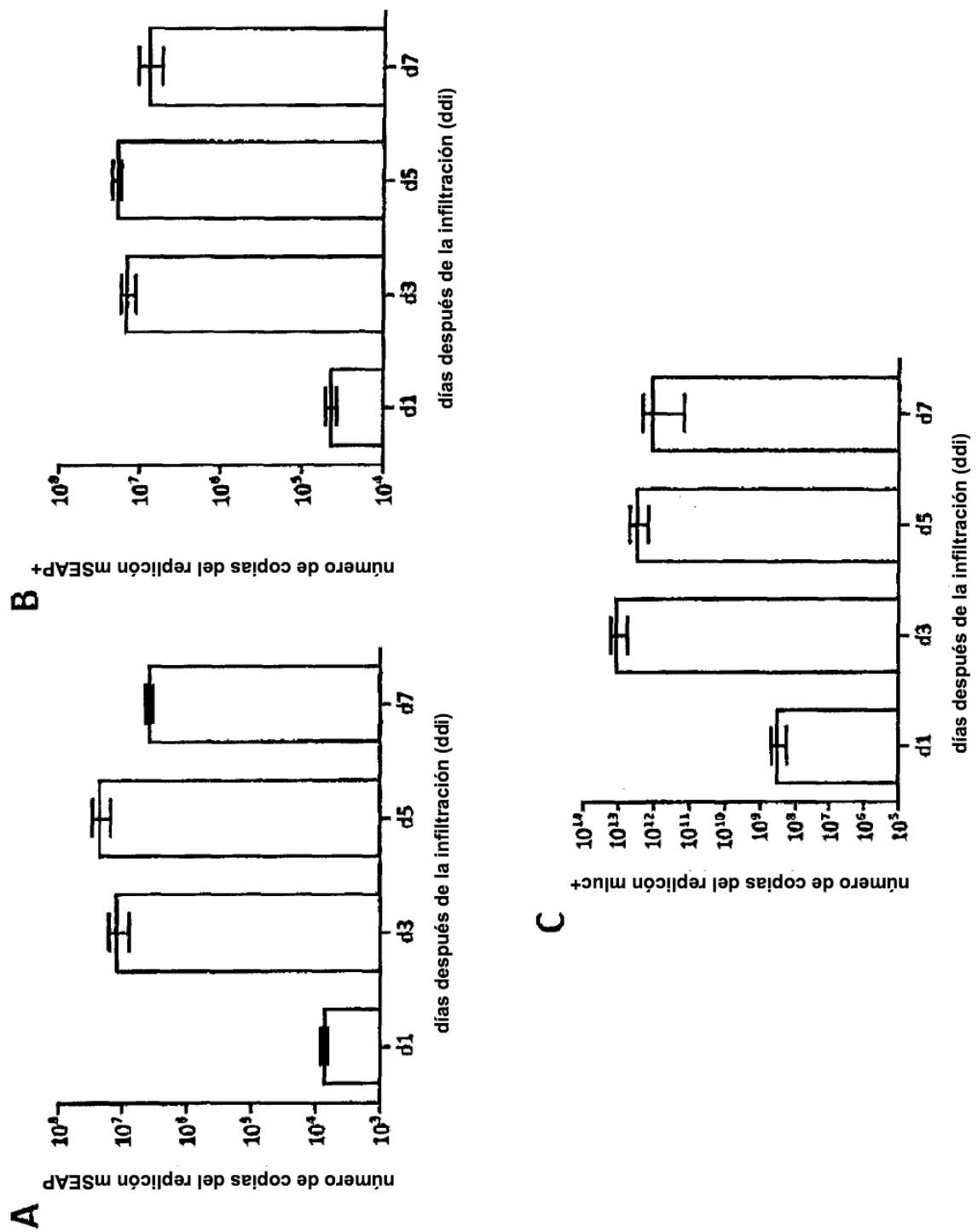


FIGURA 9

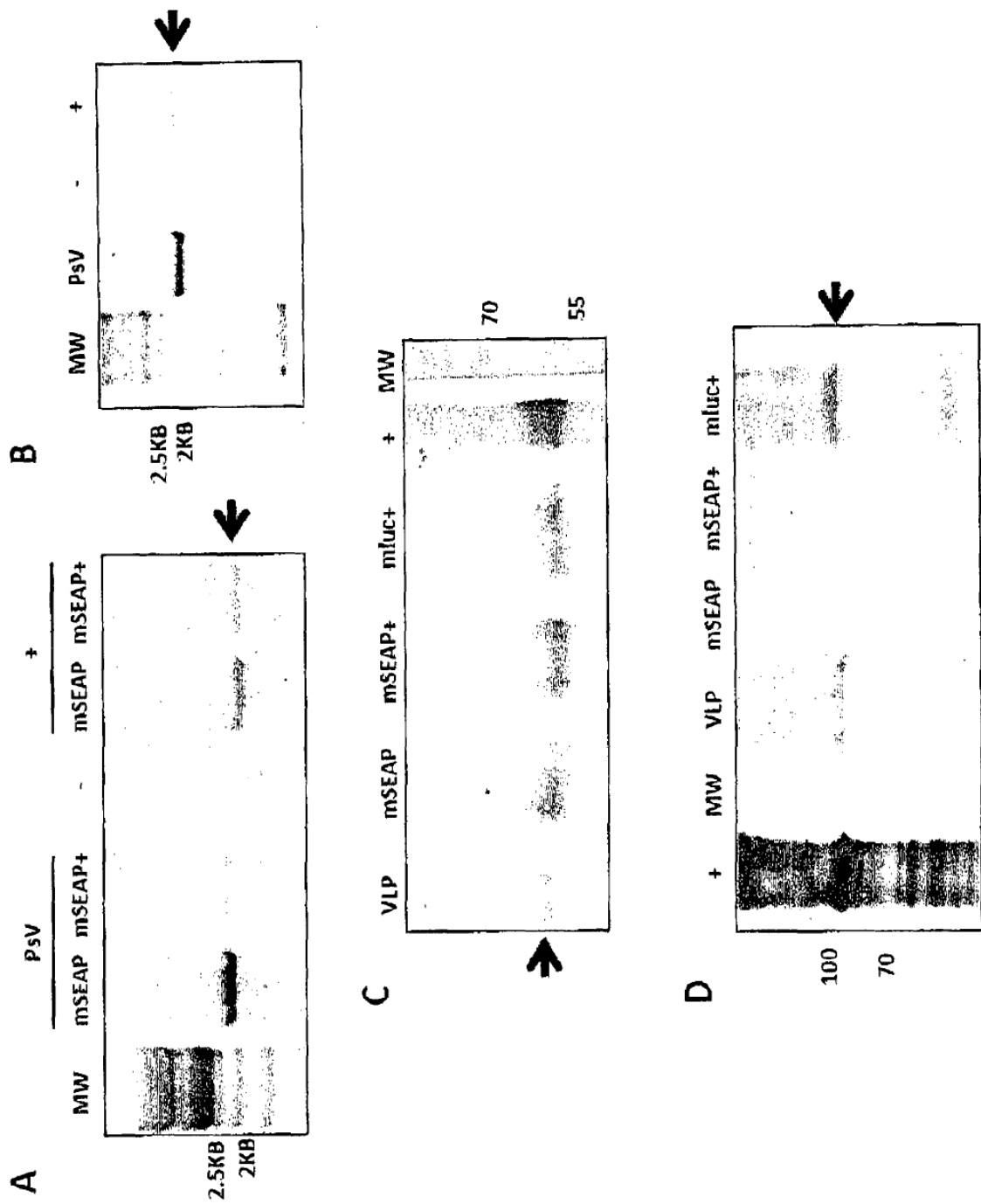


FIGURA 10

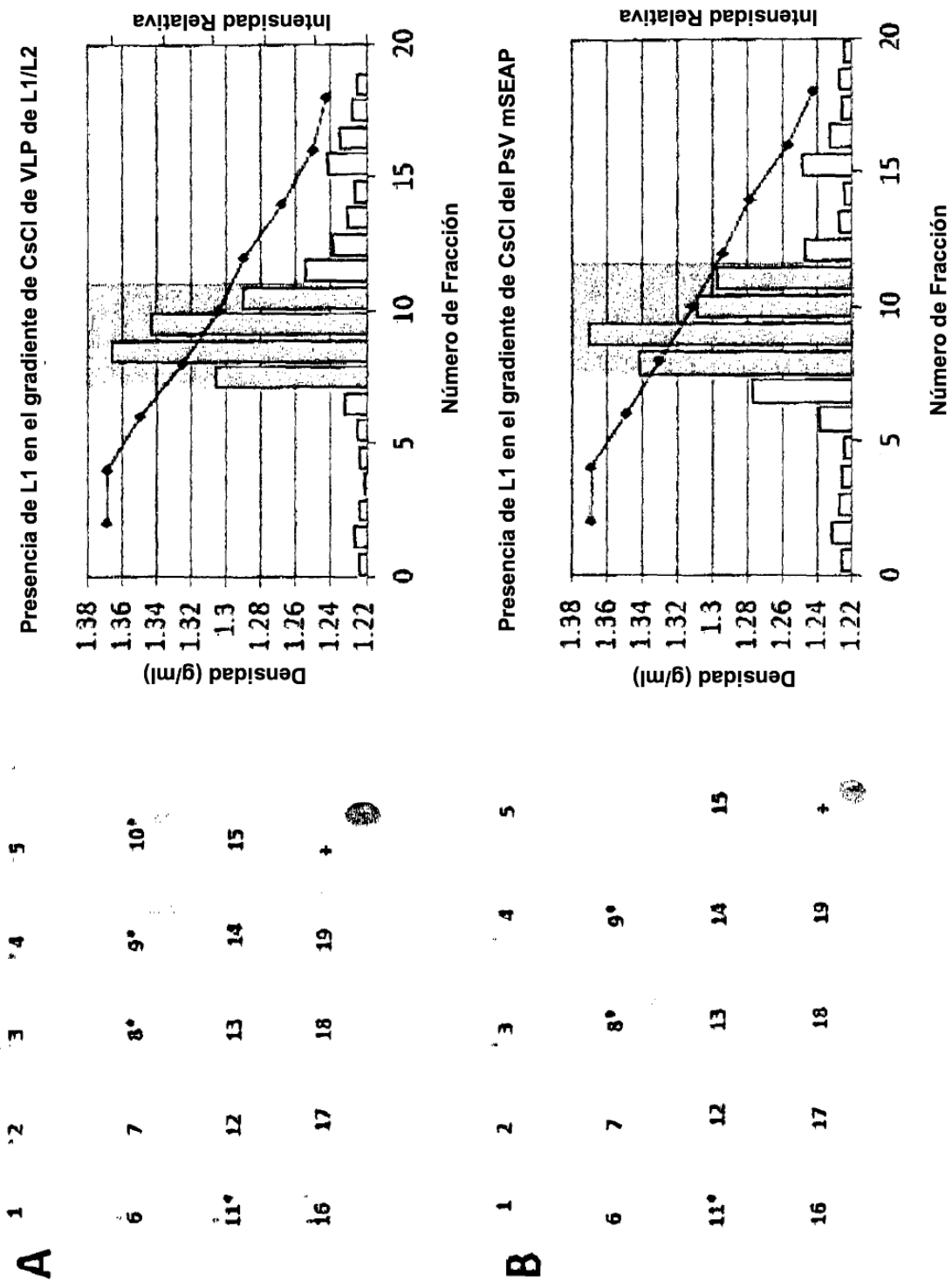


FIGURA 11

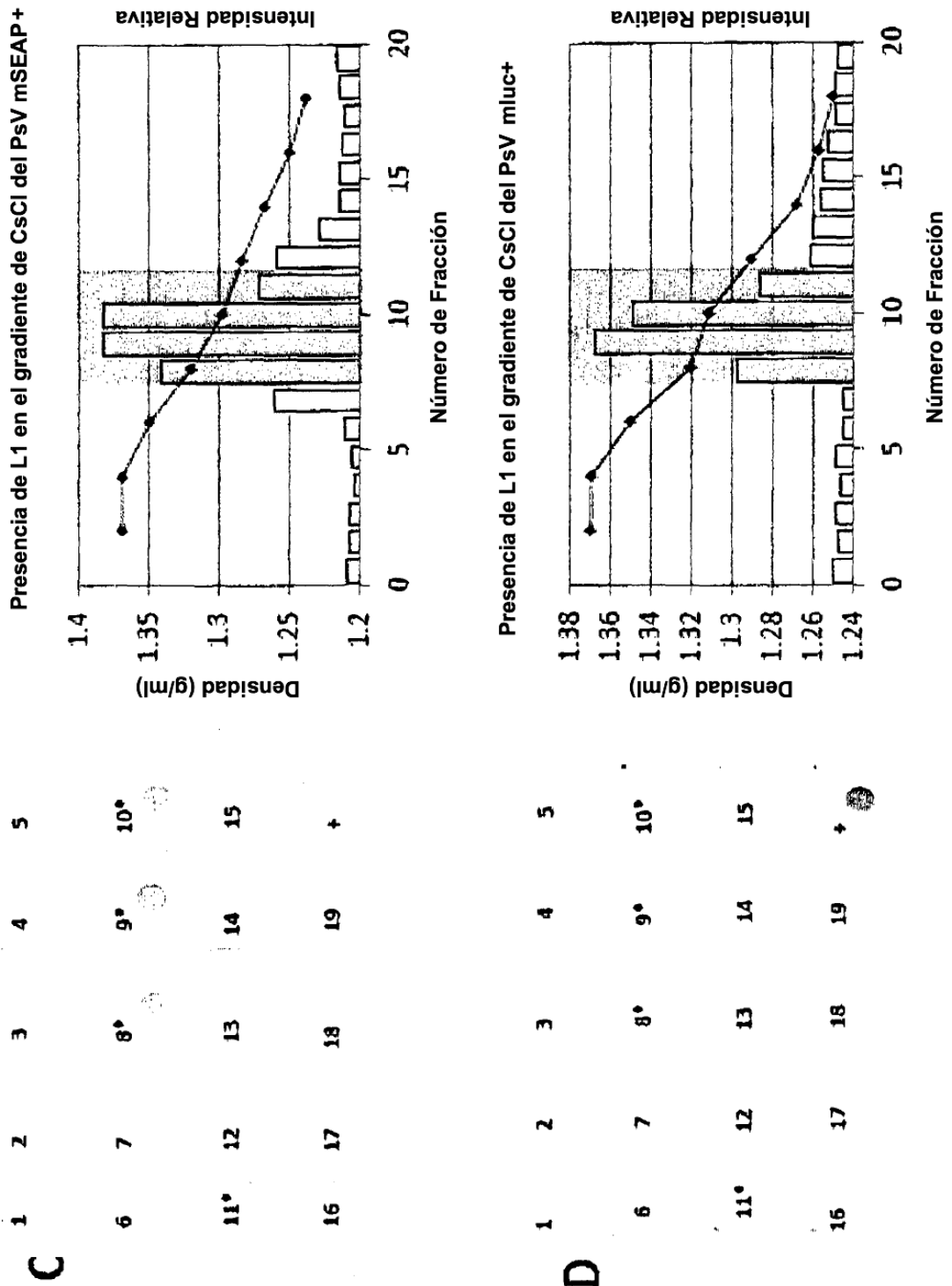


FIGURA 11 CONT

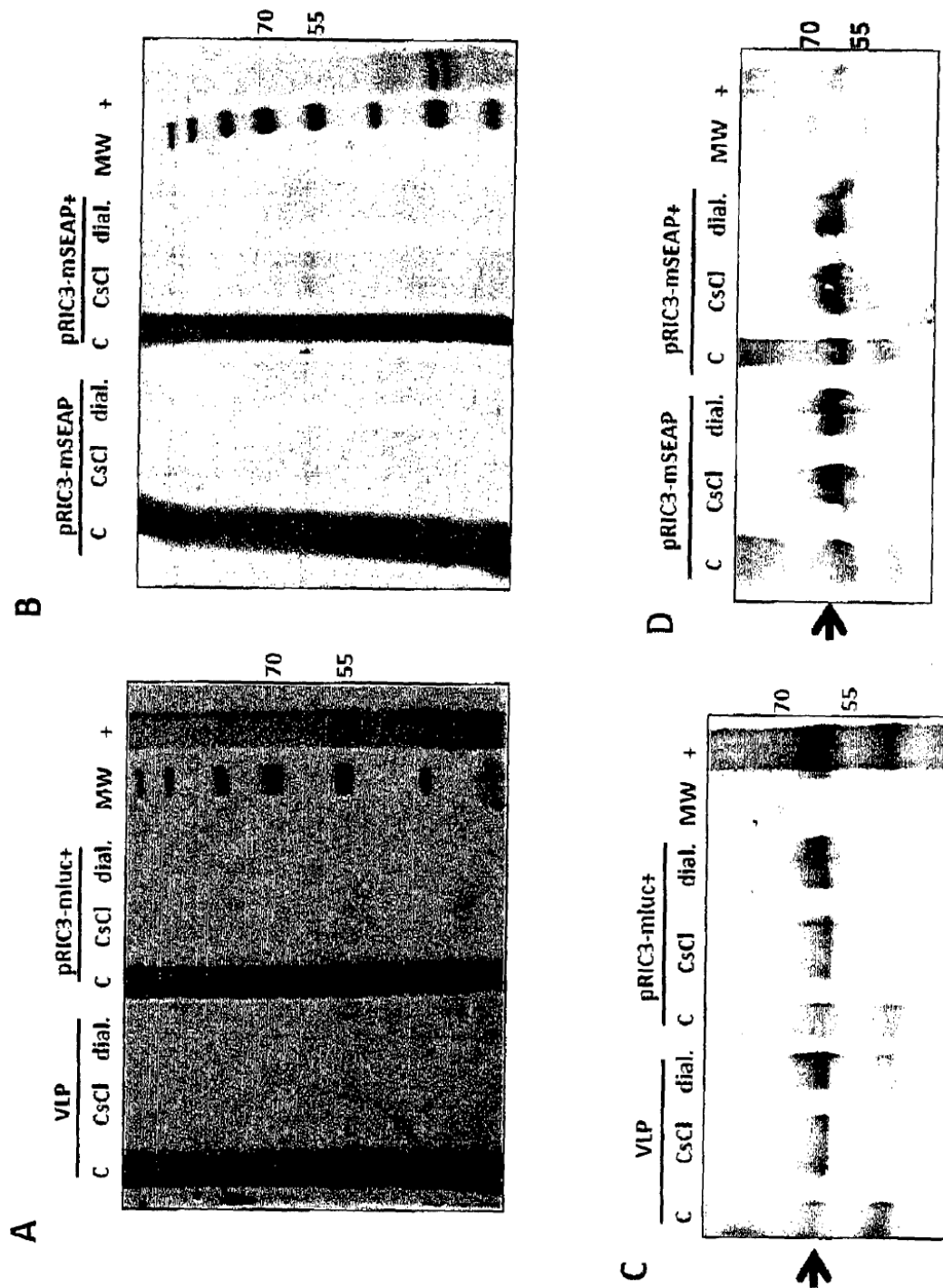


FIGURA 12

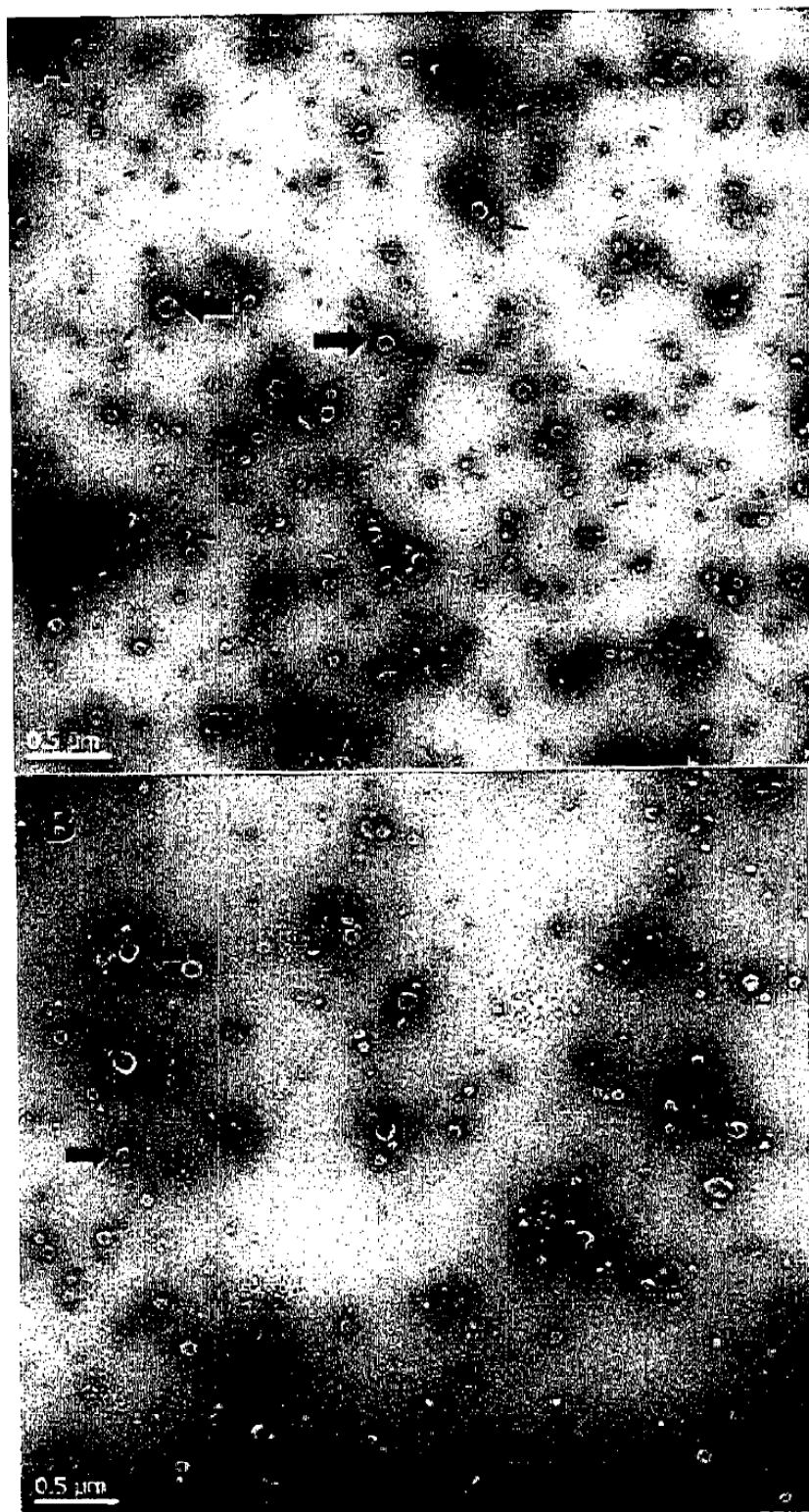


FIGURA 13

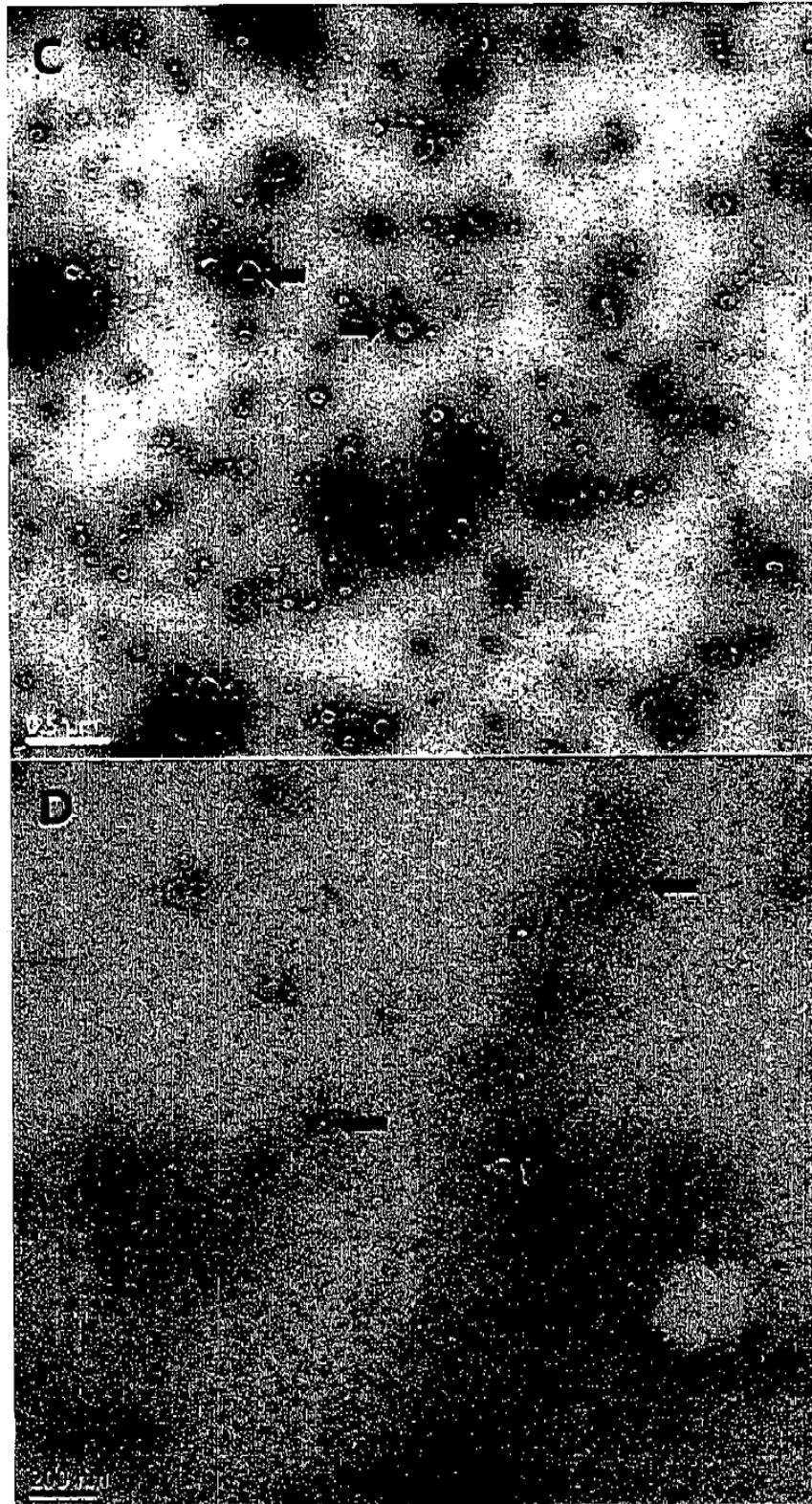


FIGURA 13 CONT

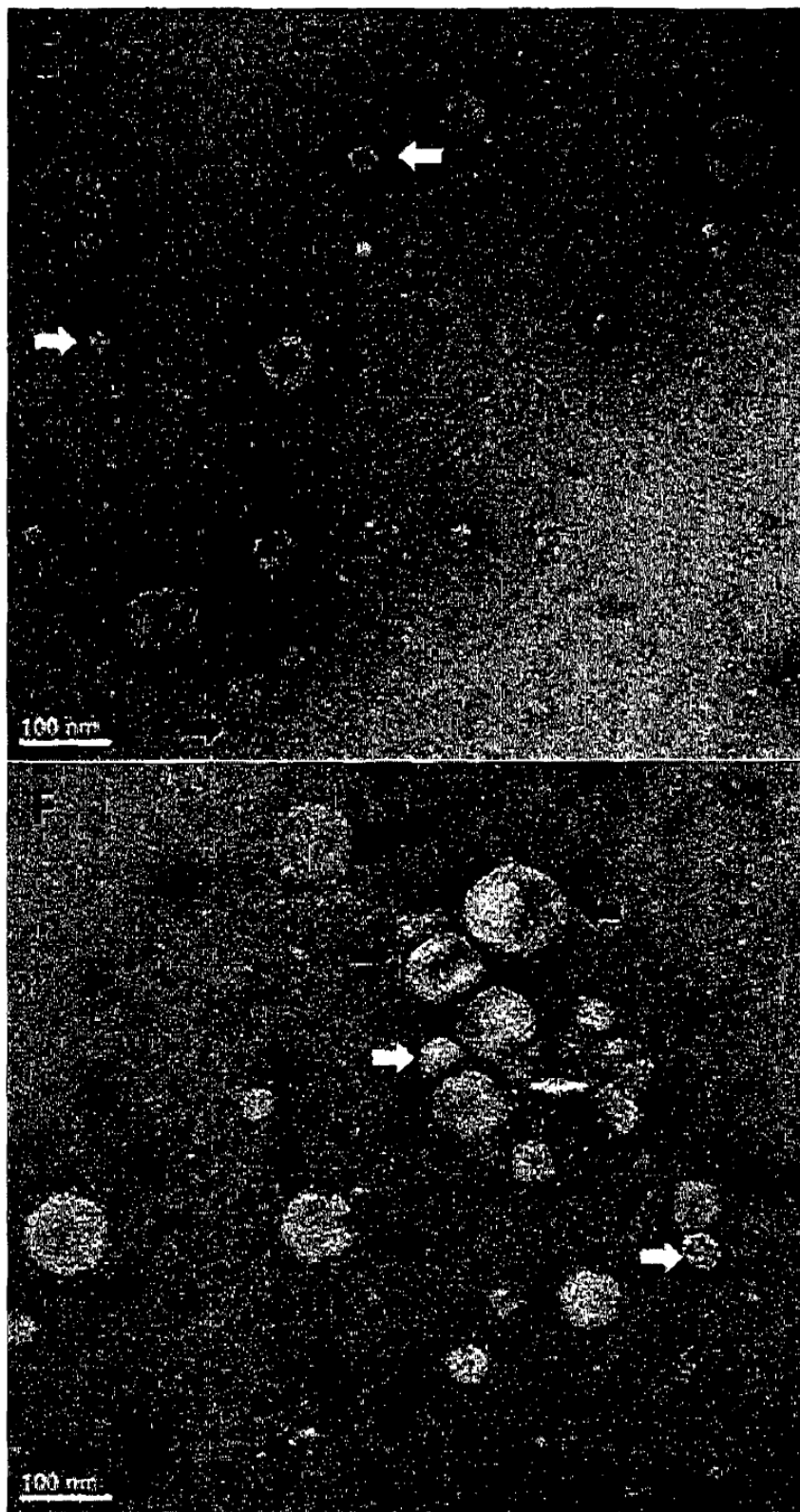


FIGURA 13 CONT



FIGURA 13 CONT

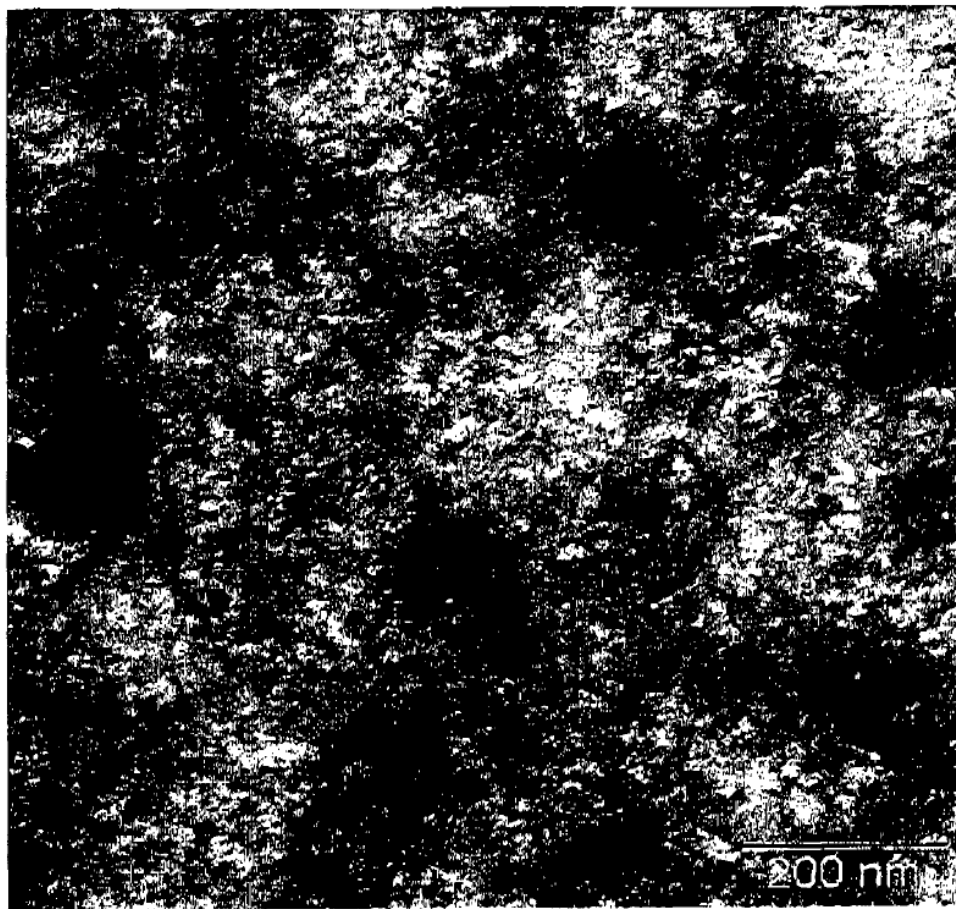


FIGURA 13 CONT

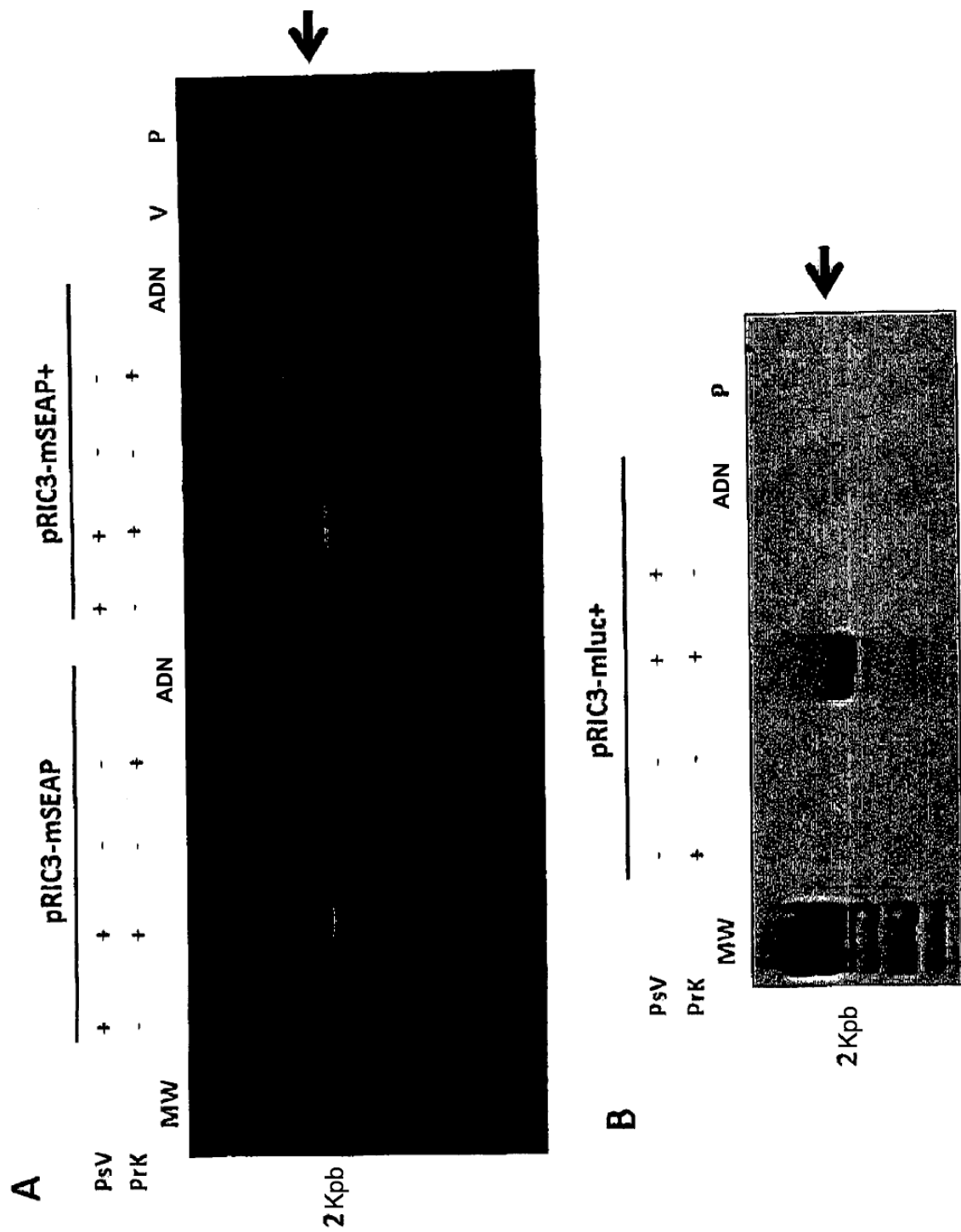


FIGURA 14

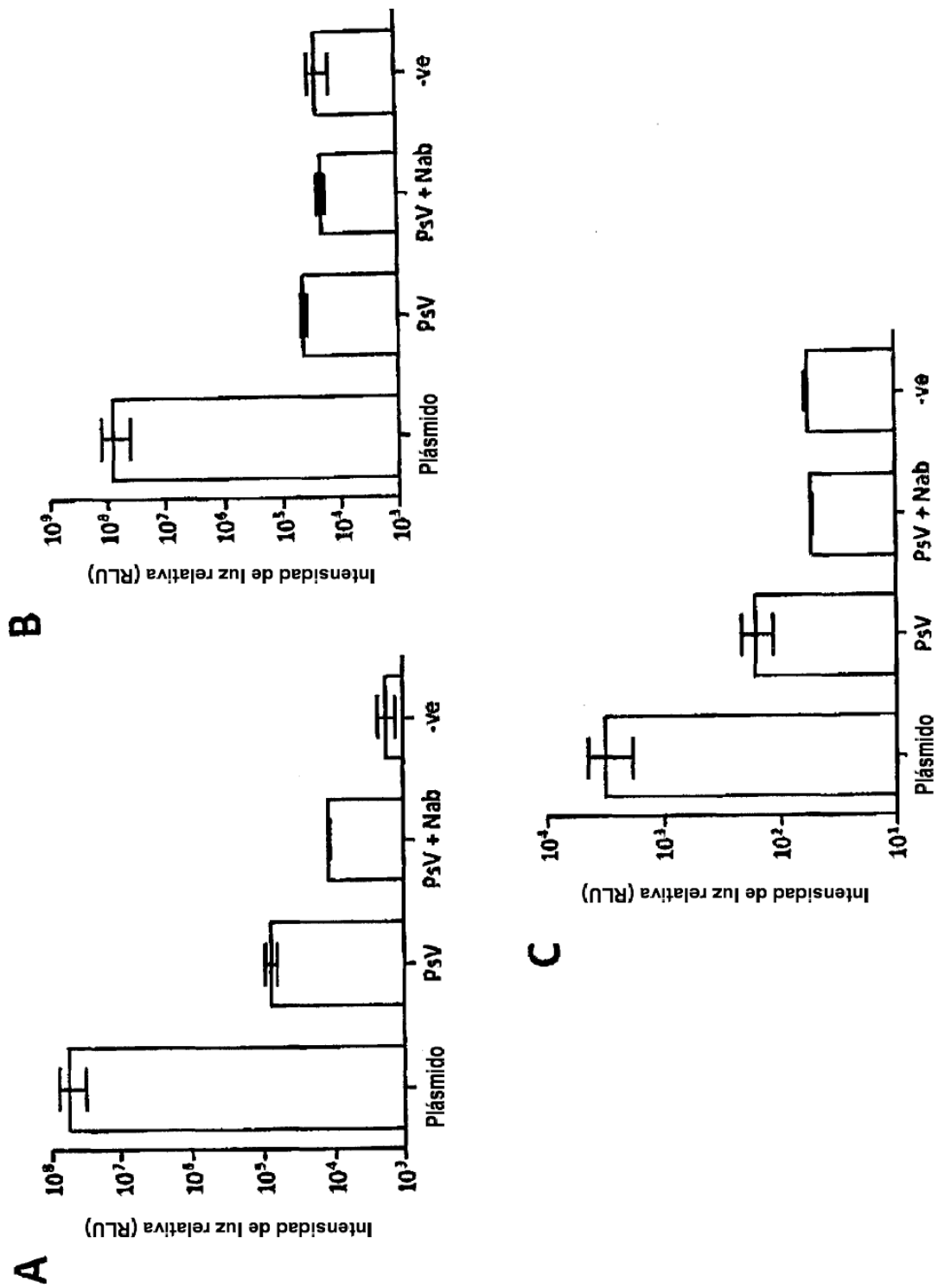


FIGURA 15

gtcgacggat	ccttatcgat	tttaccacat	ttgtagaggt	tttacttget	ttaaaaaacc	60
tcccacacct	ccccctgaac	ctgaaacata	aaatgaatgc	aattgttgtt	gttaacttgt	120
ttattgcagc	ttataatggc	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	180
catTTTTTtc	actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	240
tctgtctgaa	gcggccggcc	gccccgactc	tagagtaacc	cgggtgcgcg	gcgtcggtag	300
tgcggcgggg	gggcgcaggc	tcgcaggcgg	tgtaggggtc	caggcaggcg	gcgaaggcca	360
tgacgtgcgc	tatgaagggt	tgctcctgca	cgccgtgaac	cagggtgcgc	tgcgggccgc	420
gcgcgaacac	cgccacgtcc	tcgcctgcgt	gggtctcttc	gtccaggggc	actgctgact	480
gctgcccata	ctcggggctc	ccgctctcgc	tctcggtaac	atccggcccg	gcgcctgctc	540
tgagcacata	gcctggaccg	tttccgtata	ggaggaccgt	gtaggccctc	ctgtcccggg	600
ccttgcagg	ggccagcccg	aagatggagc	tccctgcag	ggggtagcct	ccgaaggaga	660
agacgtggga	gtggctggca	gtgacgaggc	tcagcgtgtc	ctcctcgtcg	gtgagctggc	720
ccgccccttc	aatggcgtcg	tcgaacatga	tcgtctcagt	cagtgcctcg	taagccctgc	780
tttcatgatg	accatggctg	atgcgaccac	ctccacgaa	gaggaagaag	ccgcgggggt	840
tcctgctcag	caggcgagg	gcagcctctg	tcattctccat	cagggaagg	tccagtgtgg	900
agtcctcggtg	gatctcgtat	ttcatgtctc	caggctcaaa	gagaccatg	agatgggtca	960
cagacgggtc	caggggaagg	tgcatgagct	cagtgcgggt	ccacacatac	cgggcacctt	1020
ggcgcttcgc	cagccattcc	tgcaaccagat	tcttcccgtc	cagcctgggtc	ccaccttggc	1080
tgtagtcate	tgggtaactca	gggtctgggg	ttcccatgtg	aaacatgtac	tttcggcctc	1140
cacctaggat	cacgtcaatg	tccatgttgg	agatgagctg	cgtagcgatg	tcctggcacc	1200
ctctctggcg	ggccgaggca	ggcacgtcgg	cgtccgagta	ccagttgcgg	ttcacctgtg	1260
gggcgtagggt	gcccggctggc	gaggcggtgt	gcactcgtgt	gggtggtaac	actccactgt	1320
acttccccgc	tttcttggcc	cgattcatca	cggagatgac	ctcgttgcgc	cggtcgtgtg	1380
tgcactgggt	aaagcggggc	gctgcactca	agccaatggg	ctggaagtgg	cccttgacc	1440
cgcacagata	ggccgtgggt	gtggctccac	tgcttggcac	atgtttgtct	acattgtatg	1500
tcrtggagag	agccacatat	gggaagcggg	ccatggccag	gggtatctca	ggccccagtt	1560
tgctctctct	ctgccccttt	aggaatcctg	cagctgtcac	cgtagacacc	cccatcccat	1620
cgcccaggaa	gatgatgagg	ttcttggcgg	ctgtctgtgc	aggctgcagc	ttcttggcgg	1680
cacccagggc	ctcggtgcgc	tcgcgggttc	agaagtccgg	gttctctctc	tcaactggga	1740
tgatgcccag	ggagagctgt	agcctcaggc	ccagcagcag	cagcagcagc	agcatggtag	1800
gcgaattcgc	gattcggaagc	ttacttagat	cgcagatcca	gcacaatgga	tctcgaaggt	1860
gagggatctc	tacagaattc	tcacgacacc	tgaaatggaa	gaaaaaaact	ttgaaccact	1920
gtctgagggt	tgagaatgaa	ccaagatcca	aactcaaaaa	gggcaaatc	caaggagaat	1980
tacatcaagt	gccaagctgg	cctaacttca	gtctccaccc	actcagtgtg	gggaaaactc	2040
atcgcataaa	acccctcccc	cgaacctaaa	gacgacgtac	tccaaaagct	cgagaactaa	2100
tcgagggtgc	tggaaggcgc	ccggtactcc	gtggagtcc	atgaagcgac	ggctgaggac	2160
ggaaaggccc	ttttcctttg	tgtgggtgac	tcacccgccc	gtctctccga	gcgcctcgct	2220
ctccattttg	agctccctgc	agcaggggcg	ggaagcggcc	atctttccgc	tcacgcaact	2280
gggtgcgacc	gggccagcct	tgccgcccag	ggcgggcgga	tacacggcgg	cgcgaggcca	2340
ggcaccagag	caggccgggc	agcttgagac	taccccccgt	cgattctcgg	tggcgcgcgt	2400
cgcaggcccc	gcctcgcgga	acatgtgcgc	tggaagcgac	gggccccgtc	ggcgccgcgc	2460
gccccaaaaa	ccgaaatacc	agtggtgcaga	tcttggcccc	catttacaag	actatcttgc	2520
cagaaaaaaa	gcgtcgagc	aggtcatcaa	aaattttaaa	tggttagaga	cttatcgaaa	2580
gcagcgagac	aggcgcgaag	gtgccaccag	attcgcacgc	ggcgggccca	gcgcccaggc	2640
caggcctcaa	ctcaagcacg	aggcgaagg	gtcctttaag	cgcaaggcct	cgaactctcc	2700
caccctactc	caaccggaag	ctcgggatca	agaatcacgt	actgcagcca	ggtggaagta	2760
attcaaggca	cgcaagggcc	ataacccgta	aagaggccag	gcccgcggga	accacacacg	2820
gcacttacct	gtgttcttggc	ggcaaacccg	ttgcgaaaaa	gaacgttcac	ggcgactact	2880
gcacttatat	acgggtcttc	cccacccctc	ggaaaaaggc	ggagccagta	cacgacatca	2940
ctttccagat	ttaccccgcg	ccacccctcc	taggcaccgg	ttcaattgtc	gacccctccc	3000
cccaacttct	cggggaactgt	gggcgatgtg	cgctctgccc	actgacgggc	accggagcca	3060
attcccgatc	gac					3073

FIGURA 16

gtcgacggat	ccttatcgat	tttaccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaac	60
tcccacacct	ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgttggt	gttaacttgt	120
ttattgcagc	ttataatggg	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	180
catTTTTTtc	actgcattct	agttgttggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	240
tctgtctgaa	ggggccggcc	gccccgactc	tagagtaacc	cggtgctg	gcgtcggtgg	300
tgccggcggg	gggcgcaggg	tcgcaggcgg	tgtagggtct	caggcaggcg	gcgaaggcca	360
tgacgtgcgc	tatgaaggtc	tgctcctgca	cgccgtgaac	cagggtgcgc	tgccggccgc	420
gcgcgaacac	cgccacgtcc	tcgcctgcgt	gggtctcttc	gtccaggggc	actgctgact	480
gctgccgata	ctcggggctc	ccgctctcgc	tctcggtaac	atccggcccg	gcgccgtcct	540
tgagcacata	gcctggaccg	tttccgtata	ggaggaccgt	gtaggccctc	ctgtcccggg	600
ccttgccagg	ggccagcccg	aagatggagc	tccctcgcag	gggttagcct	ccgaaggaga	660
agacgtggga	gtggctggca	gtgacgaggc	tcagctgtgc	ctcctcgtcg	gtgagctggc	720
ccgcccctct	aatggcgctc	tcgaacatga	tcgtctcagt	cagtgcgccg	taagccctgc	780
tttcatgatg	accatggctc	atgcgaccac	ctccacgaa	gaggagaag	ccgcgggggt	840
tctgtctcag	caggcgcagg	gcagcctctg	tcctctccat	cagggaagg	tccagtgtgg	900
agtctcgggt	gatctcgtat	ttcatgtctc	caggctcaaa	gagacccatg	agatgggtca	960
cagacgggtc	cagggaagcc	tgcatgagct	cagtgcgggt	ccacacatac	cgggcacctc	1020
ggcgtctcgc	cagccattcc	tgcaaccagat	tcttcccgct	cagcctgggt	ccaccttggt	1080
tgtagctatc	tggttactca	gggtctgggg	ttcccatgcg	aaacatgtac	tttcggcctc	1140
cacctaggat	cacgtcaatg	tccatgttgg	agatgagctg	cgtagcgatg	tcctggcacc	1200
cctcctggcg	ggccgagggc	ggcacgtcgg	cgtccgagta	ccagtgtcgg	ttcacctgtg	1260
ggcgtaggtg	gcccggctgg	gaggcgtgct	gcactcgtgt	ggtgggttacc	actcccactg	1320
acttcccctg	tttcttggcc	gatttcatca	cggagatgac	ctcgttgccg	cgtgtcgtgt	1380
tgcacttgggt	aaagcggggc	gctgcactca	agccaatggg	ctggaagttg	cccttgaccc	1440
cgcacaggta	ggccgtggct	gtggctccac	tgtctggcac	atgtttgtct	acattgtatg	1500
tcttggacag	agccacatat	gggaagcggg	ccatggccag	gggtatctca	ggccccagtt	1560
tgctcctctt	ctgccccttt	aggaatcctg	cagctgtcac	cgtagacacc	cccatcccat	1620
cgcaccaggaa	gatgatgagg	ttcttggcgg	ctgtctgtgc	aggctgcagc	ttcttggcgg	1680
caccacagggc	ctcggtctgc	tcgcggttcc	agaagtccgg	gttctctctc	tcaactggga	1740
tgatgcccag	ggagagctgt	agcctcaggg	ccagcagcag	cagcagcagc	agcatgggtg	1800
gcgaattctc	gattcgaagc	ttacttagat	cgcagatcca	gcacaatgga	tctcgagggtc	1860
gagggatctc	tacagaattc	tcacgacacc	tgaaatggaa	gaaaaaaact	ttgaaccact	1920
gtctgagget	tgagaatgaa	ccaagatcca	aactcaaaaa	gggcaaatcc	caaggagaat	1980
tacatcaagt	gccaaagctg	cctaacttca	gtctccaccc	actcagtgtg	gggaaactcc	2040
atcgcataaa	acccctcccc	ccaacctaaa	gacgacgtac	tccaaaagct	cgaagaactaa	2100
tcgaggtgct	tggaaggcgc	ccgggtactc	gtggagtca	atgaagcgac	ggctgaggac	2160
ggaaaggccc	ttttcttttg	tgtgggtgac	tcacctcgcc	gctctcccga	gcgccgcgtc	2220
ctccattttg	agctcccctg	agcagggcgg	ggaagcggcc	atctttccgc	tcacgcaact	2280
ggtgcccagc	gggcccagct	tgccgcccag	ggcggggcga	tacacggcgg	cgcgaggcca	2340
ggcaccagag	caggccggcc	agcttgagac	taccccccgt	cgttctcgg	tgggccgcgt	2400
cgcaggccccc	gctctgcgca	acatgtgcgc	tgggacgcac	gggccccgtc	gccgcccgcg	2460
gccccaaaaa	ccgaaatacc	agtgtgcaga	cttgggcccg	catttacaag	actatcttgc	2520
cagaaaaaaa	gcgtcgcagc	aggtcatcaa	aaatttttaa	tggttagaga	cttatcgaaa	2580
gcagcgagac	aggcgcgaag	gtgccaccag	attcgcacgc	ggcggcccca	gcgccagggc	2640
caggccctcaa	ctcaagcacg	aggcgaagg	gctccttaag	cgcaaggcct	cgaactctcc	2700
caccacattc	caaccgaaag	ctcgggatca	agaatcacgt	actgcagcca	ggtggaagta	2760
attcaaggca	cgcaagggcc	ataacctgta	aagaggccag	gcccgcggga	accacacacg	2820
gcacttacct	gtgttcttgc	ggcaaaaccg	ttgcgaaaaa	gaacgttcac	ggcgactact	2880
gcacttatat	acgggttctc	cccacccctc	ggaaaaaggg	ggagccagta	cacgacatca	2940
ctttcccagt	ttaccccgcg	ccacctcttc	taggcaccgg	ttcaattgct	gacccctccc	3000
cccaacttct	cggggactgt	gggcgatgtg	cgtctgccc	actgacgggc	accggagcca	3060
attcccagtc	gacctgttcc	aaagaccaga	gggttattga	gacttttcaa	caaagggtta	3120
tatcgggaaa	cttctctgga	ttccattgcc	cagctatctg	tcacttctac	gaaaggacag	3180
tagaaaaagg	agatggcttc	tacaaatgcc	atcattgcga	taaaaggaaag	gctatcgttc	3240
aagatgcttc	taccgacagt	ggtcccaaa	atggaccccc	acccacgagg	aacatcgtgg	3300
aaaaagaaga	cgttccaacc	acgtcttcaa	agcaagtggg	ttgatgtgat	acatgggtga	3360
gcacgacact	ctcgtctact	ccaagaatat	caaagatata	gtctcagaag	accagagggc	3420
tattgagact	tttcaacaaa	gggtaatatc	gggaaacctc	ctcggattcc	attgcccagc	3480
tatctgtcac	ttcatcgaaa	ggacagtaga	aaagggaagat	ggttcttaca	aatgccatca	3540
ttgcgataaa	ggaaaggcta	tcgttcaaga	tgctcttacc	gacagtgggt	ccaaagatgg	3600
acccccaccc	acgaggaaca	tcgtggaaaa	agaagacggt	ccaaccacgt	cttcaaaagc	3660
agtggaattga	tgtgatattc	ccaactgacgt	aagggaatgac	gcacaatccc	actatcttcc	3720

FIGURA 17

gcaagaccct	tcctctatat	aaggaagttc	atttcatttg	gagaggacac	gctgagttca	3780
caacacaaat	cagattttata	gagagattta	taaaaaaaaa	aaaacatgtg	atcccgggaa	3840
ttcgctagca	ctagaggatc	cccgggtacc	ggtcgccacc	ctagagtcgc	ggccgcttta	3900
cttgtagcgc	tcgtccatgc	cgagagtgat	cccggcggcg	gtcacgaact	ccagcaggac	3960
catgtgateg	cgcttctcgt	tggggctett	gctcaggggcg	gactgggtgc	tcaggtagtg	4020
gttgtcgggc	agcagcacgg	ggccgtcgcc	gatgggggtg	ttctgctggt	agtggtcggc	4080
gagctgcacg	ctgccgtcct	cgatgttggt	gcggatcttg	aagttcacct	tgatgccgtt	4140
cttctgcttg	tcggccatga	tatagacgtt	gtggctgttg	tagttgtact	ccagcttggt	4200
ccccaggatg	ttgccgtcct	ccttgaagtc	gatgcccttc	agctcgatgc	ggttcaccag	4260
ggtgtcgccc	tcgaacttca	cctcggcgcg	ggtcttgtag	ttgccgtcgt	ccttgaagaa	4320
gatggtgcgc	tcctggacgt	agccttcggg	catggcggac	ttgaagaagt	cgtgctgctt	4380
catgtggtcg	gggtagcggc	tgaagcactg	cacgccgtag	gtcagggtgg	tcacgagggt	4440
gggccagggc	acgggcagct	tgccgggtgt	gcagatgaac	ttcagggtca	gcttgccgta	4500
ggtggcatcg	ccctcgccct	cgcgggacac	gctgaacttg	tggccgttta	cgtcgccgtc	4560
cagctcgacc	aggatgggca	ccaccccggt	gaacagctcc	tcgcccttgc	tcaccatagt	4620
ccgcaaaaat	caccagtcct	tctctacaaa	tctatctctc	tctatttttc	tccagaataa	4680
tgtgtgagta	gttcccagat	aagggaaatta	gggttcttat	agggtttcgc	tcattgtgtg	4740
agcatataag	aaaccccttag	tatgtatttg	tattttgtaa	atacttctat	caataaaatt	4800
tctaattcct	aaaaccaaaa	tccagtgaac	gggcggcggc	tcgag		4845

FIGURA 17 CONT

gtcgcagata	tgcgcatttt	tccaaaagtg	atTTTTgggc	atacgcgata	tctggcgata	60
gcgcttatat	cgrrracggg	ggatggcgat	agacgacttt	ggtgacttgg	gcgattctgt	120
gtgtcgcaaa	tatcgagtt	tcgatatagg	tgacagacga	tatgaggcta	tatcgccgat	180
agaggcgaca	tcaagctggc	acatggccaa	tgcatatcga	tctatacatr	gaatcaatat	240
tggccattag	ccatattatt	cattgggtat	atagcataaa	tcaatatttg	ctattggcca	300
ttgcatacgt	tgtatccata	tcataatatg	tacatttata	ttggctcatg	tccaacatta	360
ccgcatgttt	gacattgatt	attgactagt	agggtgtcgt	aggctcagca	aaattacggg	420
ccactgggt	cttccacaaa	ccgggcgggc	ccactatgac	gtgtacagct	gtcttccaat	480
cacgctgctg	catcttcccg	ctcactttca	aaagttcagc	cagcccgcg	aaatttctca	540
catacgttac	agggaaactg	tccatattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacgggggt	600
atragttcat	agcccatata	tggagtttccg	cggtacataa	cttacggtaa	atggcccgcc	660
tggctgaccg	cccaacgacc	cccggccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	720
aacgcccaata	gggactttcc	attgacgtca	atgggtggag	tatttacggg	aaactgccc	780
cttggcgagta	catcaagtg	atcatatgcc	aagtacgccc	cttattgacg	tcaatgacgg	840
taaaaggccc	gcctggcatt	atgcccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	900
gtacatctaac	gtattagtea	tcgctattac	catgggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	960
tggcggtgga	tagcggtttg	actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	1020
tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	ggacttttcca	aaatgtcgt	acaactccgc	1080
ccatttgacg	caaattgggg	gtaggcggtg	acgggtggag	gtctatataa	gcagagctcg	1140
tttagtgga	cgtagatcg	ccaggagacg	ccatgccacg	tggtttgacc	tccatagaag	1200
acaccgggac	gacatccagc	tccgcgcccg	ggaacgggtg	attggaacgc	ggattccccg	1260
tgccaagagt	gacgtaagta	ccgctatag	agtctatagg	cccacccct	tggtctctta	1320
tgcattgctat	actgtttttg	gcttgggggt	tatacacccc	cgcttccct	tggtataggt	1380
gatggatarag	cttagcctat	agggtgtgggt	tattgaccat	tattgaccac	tccccatttg	1440
gtgacgatac	tttccattac	taattccataa	catggctctt	tggcacaact	ctctttattg	1500
gctatatgcc	aatacactgt	cttccagaga	ctgacacgga	ctctgtattt	ttacaggatg	1560
gggtctcatt	tattattttac	aaattccacat	atacaacacc	accgtcccc	gtgcccgag	1620
tttttattaa	acataacgtg	ggatctccac	gcgaatctcg	ggtacgtgtt	ccggacattg	1680
gtctttcttc	ggtagcggg	gagcttctac	atccgagccc	tgctcccatg	ctccacgca	1740
ctcatgggtg	ctcggcagct	cttgcctct	aacagtggag	gccagactta	ggcacagcac	1800
gatgcccacc	accaccagtg	tgccgcacaa	ggccgtggcg	gtagggtatg	tgcttgaaaa	1860
tgagctcggg	gagcgggctt	gcaccgctga	cgattttgga	agacttaagg	cagcggcaga	1920
agaagatgca	ggcagctgag	ttgttgtgtt	ctgataagag	tcagaggtaa	ctcccggttc	1980
gggtgctgta	acgggtggag	gcagtgtagt	ctgagcagta	ctcgttgctg	ccgcgcgcgc	2040
caccagacat	aatagctgac	agactaacag	actgttccct	tccatgggtc	ttttctgcag	2100
tcaccgtcct	tgacacgaag	cttatggaag	acgccaaaa	cataaagaaa	ggcccggcgc	2160
cattctatcc	gctggaagat	ggaaccgctg	gagagcaact	gcataagggt	atgaagagat	2220
acgcccgtgt	tccgtggaaca	attgctttta	cagatgcaca	tatcgagggtg	gacatcactt	2280
acgtgagta	cttcgaatatg	tccgttcggt	tggcagaagc	tatgaaacga	tatgggctga	2340
atacaaatca	cagaatcgct	gtatgcagtg	aaaactctct	tcaattcttt	atgccgggtg	2400
tgggcgcgtt	atttatcgga	gttgcagttg	cgcccgcgaa	cgacatttat	aatgaacgtg	2460
aatgtgctcaa	cagtatgggc	atttcgcagc	ctaccgtggg	gttcgtttcc	aaaaaggggg	2520
tgcaaaaaat	tttgaacgtg	caaaaaaagc	tcccaatcat	ccaaaaaatt	atttatcatgg	2580
attctaaaaac	ggattaccag	ggatttcagt	cgatgtacac	gttcgtcaca	tctcatctac	2640
ctcccggttt	taatgaatac	gattttgtgc	cagagtcctt	cgatagggac	aagacaattg	2700
cactgatcat	gaactcctct	ggatctactg	gtctgcctaa	agggtgcgt	ctgcccata	2760
gaactgcctg	cgtgagattc	tcgcatgcc	gagatcctat	ttttggcaat	caaatcattc	2820
cggaatactgc	gatttttaagt	gttgttccat	tccatcacgg	ttttggaatg	tttactacac	2880
tcggatatttt	gatattgtgga	tttcgagtcg	tcttaatgta	tagatttgaa	gaagagctgt	2940
ttctgaggag	ctttcaggat	tacaagattc	aaagtgcgt	gctgggtgca	accctattct	3000
cttctcttcgc	caaaaagcact	ctgattgaca	aatacgattt	atctaattta	cacgaatttg	3060
cttctggttg	cgctcccttc	tctaagggaag	tcggggaagc	ggttgccaag	aggttccatc	3120
tgccagggtat	caggcaagga	tatgggtcca	ctgagactac	atcagctatt	ctgattacac	3180
ccgaggggga	tgataaacgg	ggcgcggtcg	gtaaagtgtg	tccatttttt	gaagcgaagg	3240
ttgtggatct	ggataccggg	aaaacgctgg	cggttaatca	aagaggcgaa	ctgtgtgtga	3300
gagggtcctat	gattatgtcc	ggttatgtaa	acaatccgga	agcgaccaac	gccttgattg	3360
acaaggatgg	atggctacat	tctggagaca	tagcttactg	ggacgaagac	gaacacttct	3420
tcattcgttga	ccgcttgaag	tctctgatta	agtaacaagg	ctatcagggtg	gctcccgcgtg	3480
aattggaatc	catcttgttc	caacacccca	acatcttcga	cgagggtgtc	gcagggtcttc	3540
ccgacgatga	cgccgggtgaa	cttcccgcgg	ccgttgttgt	tttggagcac	ggaaagacga	3600
tgacggaaaa	agagatcgtg	gattacgtcg	ccagtcaggt	aacaaccgcg	aaaaagttgc	3660
gcggaggagt	tgtgtttgtg	gacgaagtac	cgaaagggtct	taccggaaaa	ctcgacgcaa	3720

FIGURA 18

gaaaaatcag	agagatcctc	ataaaggcca	agaagggcgg	aaagatcgcc	gtgtaatcta	3780
gagggcccta	ttctatagtg	tcacctaaat	gctagagctc	gctgacagc	ctcgactgtg	3840
ccttctagtt	gccagccatc	tggtgtttgc	ccccccccc	tgcccttcct	gaccttgga	3900
gggtccactc	ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	3960
aggtgtcatt	ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	4020
gacaatagca	ggcatgtctg	ggatgcgggtg	ggctctatgg	cttctgaggc	ggaaagaacc	4080
agctggggct	cgacctgggtc	caaagaccag	agggctattg	agacttttca	acaaagggtta	4140
atategggaa	acctcctcgg	attccattgc	ccagctatct	gtcacttcat	cgaaaggaca	4200
gtagaaaagg	aagatggctt	ctacaaatgc	catcattgctg	ataaaggaaa	ggctatcggt	4260
caagatgcct	ctaccgacag	tggtcccaaa	gatggacccc	caccacgag	gaacatcggtg	4320
gaaaaagaag	acgttccaac	cacgtcttca	aagcaagtgg	attgatgtga	tacatgggtg	4380
agcacgacac	tctctgtctac	tccaagaata	tcaaagatac	agtctcagaa	gaccagaggg	4440
ctattgagac	ttttcaacaa	agggtaatat	cgggaaacct	cctcggattc	cattgccag	4500
ctatctgtca	cttcatcgaa	aggacagtag	aaaagggaaga	tggtctctac	aaatgccatc	4560
attgcgataa	aggaaaaggct	atcgtttcaag	atgcctctac	cgacagtgggt	cccaaagatg	4620
gacccccacc	cacgaggaac	atcgtggaaa	aagaagacgt	tccaaccacg	tcttcaaagc	4680
aagtggattg	atgtgatatc	tccactgacg	taagggatga	cgcacaatcc	cactatcctt	4740
cgcaagaccc	ttcctctata	taagggaagtt	catrttcat	ggagaggaca	cgctgagttc	4800
acaacacaaa	tcagatttat	agagagattt	ataaaaaaaa	aaaaacatgt	gatcccgga	4860
attcgttagc	actagaggat	ccccgggtac	cggtcgccac	cctagagtcg	cggccgcttt	4920
acttgtacag	ctcgtccatg	ccgagagtga	tcccggcgcc	ggtcacgaac	tccagcagga	4980
ccatgtgac	gcgcttctcg	ttgggggtctt	tgctcagggc	ggactgggtg	ctcaggtagt	5040
gggtgtcggg	cagcagcacg	gggcccgtcgc	cgatgggggt	gttctgctgg	tagtggtcgg	5100
cgagctgcac	gctgccgtcc	tcgatgttgt	ggcggatctt	gaagtccacc	ttgatgccgt	5160
tcttctgctt	gtcggccatg	atatagacgt	tggtggctgtt	gtagtgttac	tccagcttgt	5220
gccccaggat	gttgccgtcc	tccttgaaagt	cgatgccctt	cagctcgatg	cggttcacca	5280
gggtgtcggc	ctcgaacttc	acctcggcgc	gggtcttgta	gttgccgtcg	tccttgaaga	5340
agatgggtcg	ctcctggacg	tagccttcgg	gcattggcga	cttgaagaag	tcgtgctgct	5400
tcattgtggc	ggggtagcgg	ctgaagcact	gcacgccgta	ggtcagggtg	gtcacgaggg	5460
tgggccaggg	cacgggcagc	ttgccgggtg	tgcatgatgaa	cttcagggtc	agcttgccgt	5520
aggtggcatc	gcccgcggc	tcgccggaca	cgctgaactt	gtggccggtt	acgtcggcgt	5580
ccagctcgac	caggatgggc	accaccccgg	tgaacagctc	ctcggccctg	ctcaccatag	5640
tcgcgaaaaa	tcaccagttc	ctctctacaa	atctatctct	ctctatctt	ctccagaata	5700
atgtgtgagt	agttcccaga	taagggaatt	aggggttctta	taggggttcg	ctcatgtgtt	5760
gagcatataa	gaaaccctta	gtatgrattt	gtatttgttaa	aatacttcta	tcaataaaat	5820
ttctaattcc	taaaaccaaa	atccagtgc	cgggcggcgg	ctcgag		5866

FIGURA 18 CONT

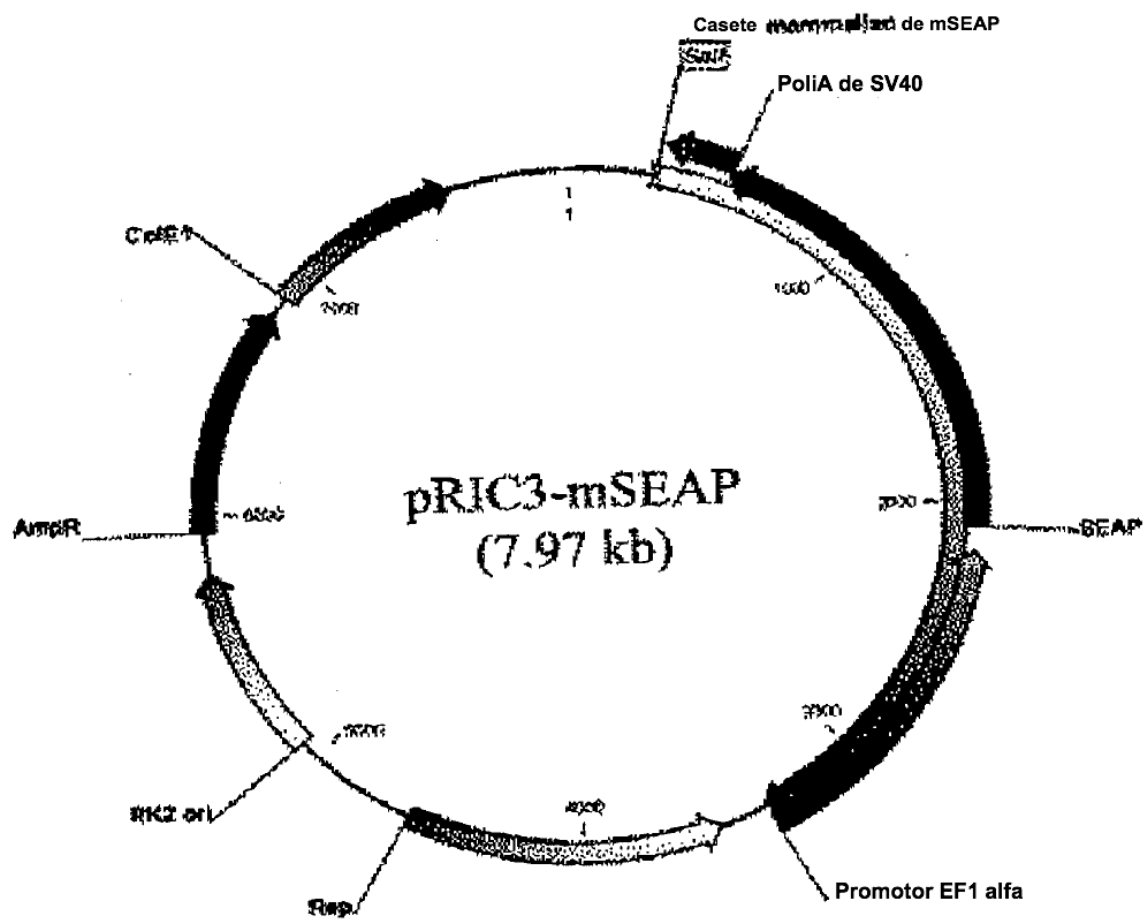


FIGURA 19

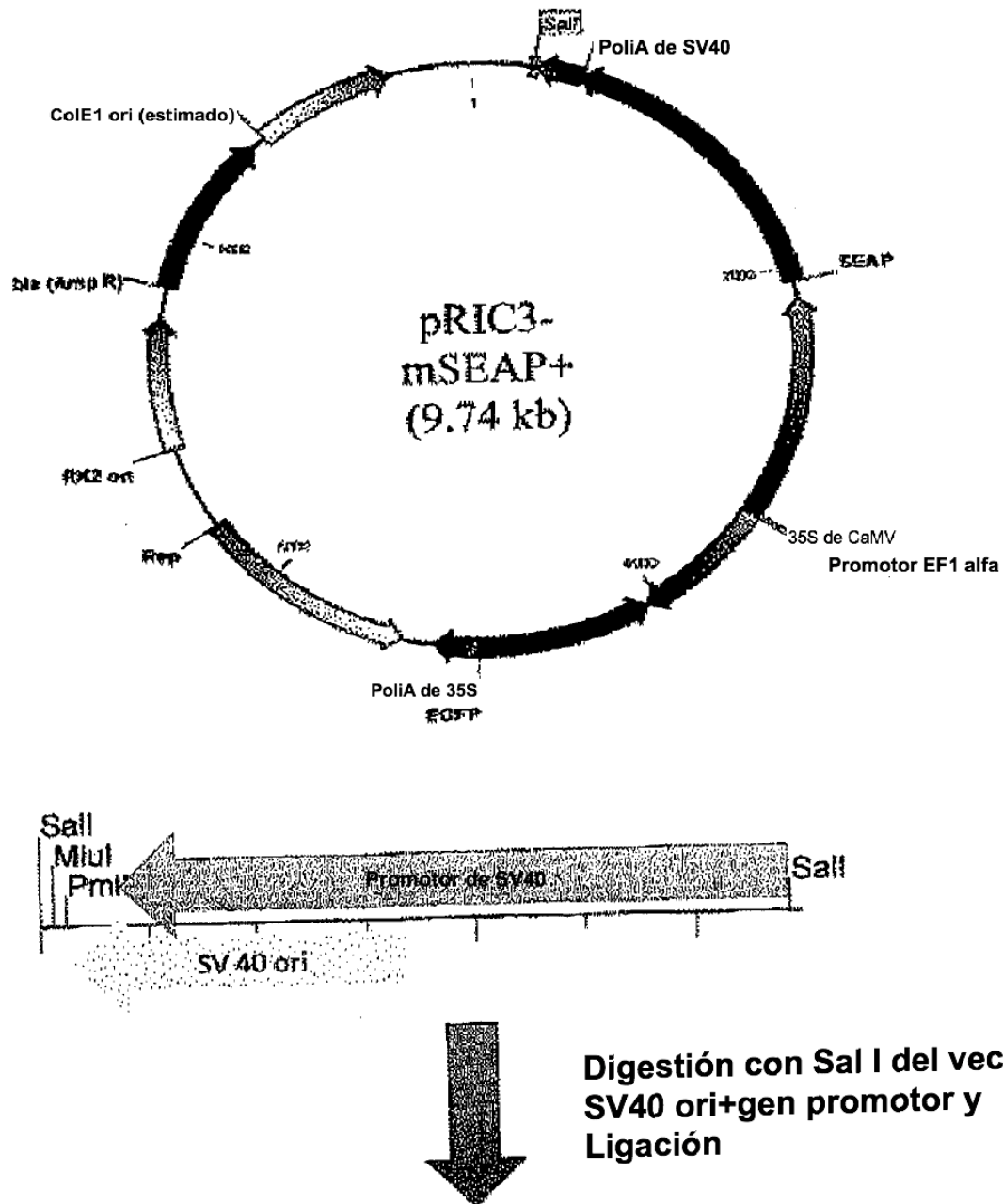


FIGURA 19 CONT

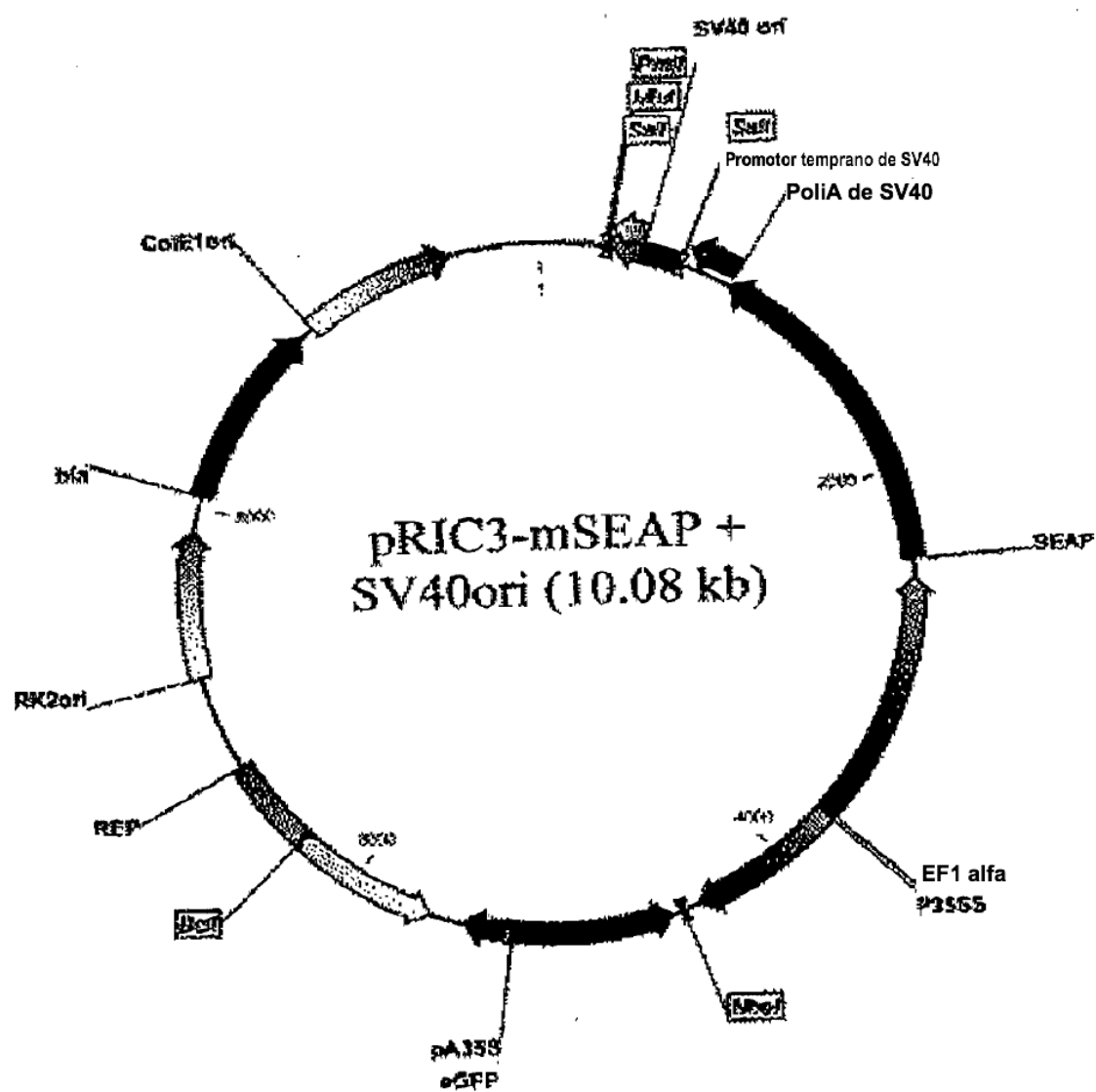


FIGURA 19 CONT

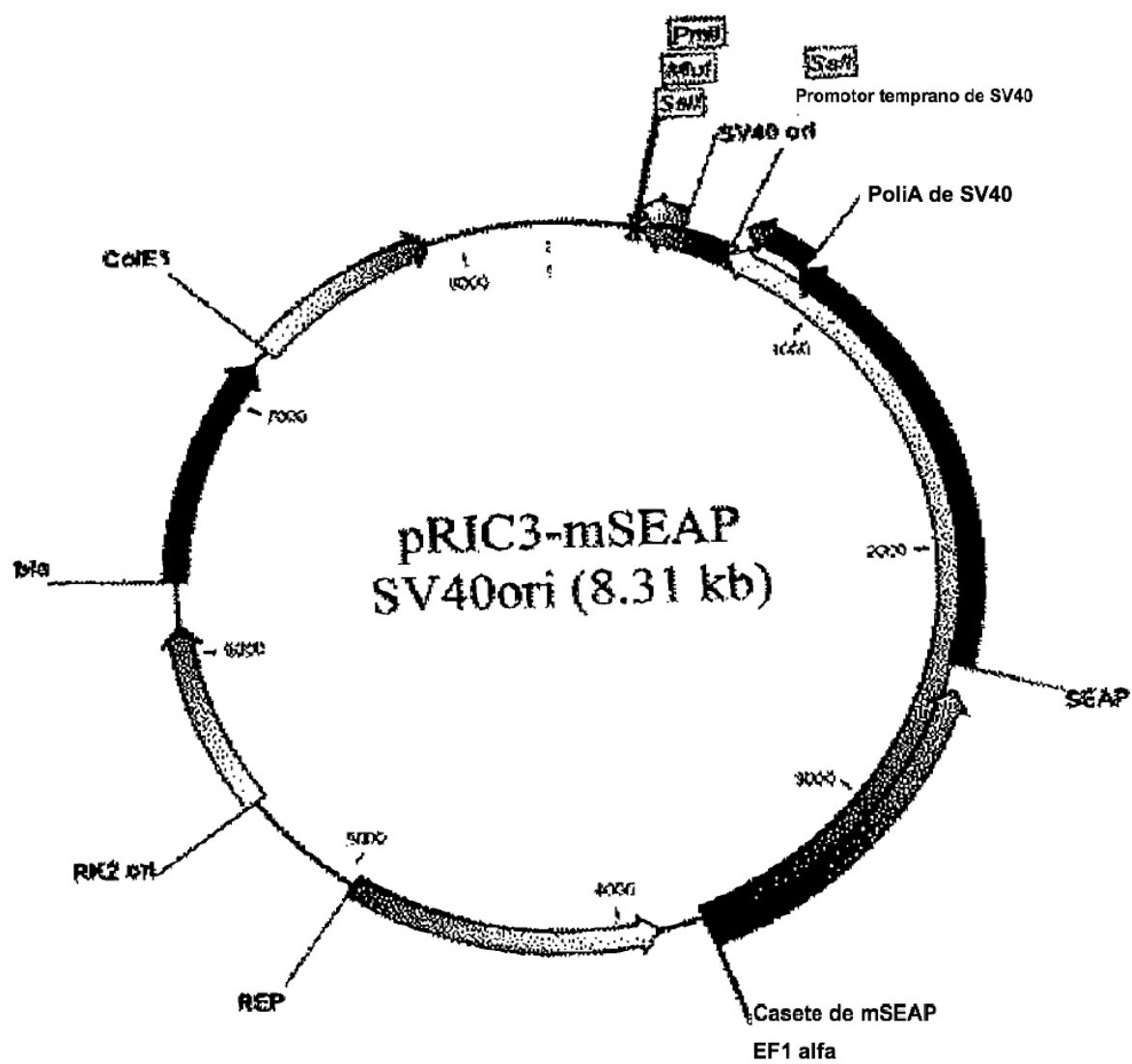


FIGURA 19 CONT

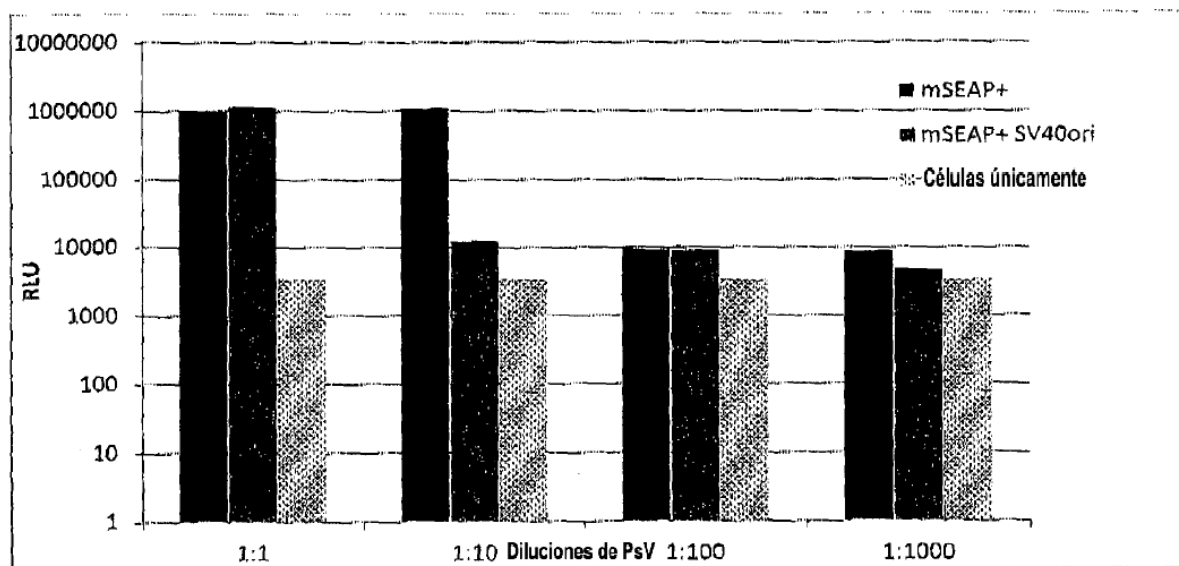


FIGURA 20