



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 745**

51 Int. Cl.:
C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04728627 .3**

86 Fecha de presentación : **21.04.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1616012**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **Promotores bidireccionales de síntesis y utilización de los mismos.**

30 Prioridad: **24.04.2003 US 465080 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE
DEL MONTE TABOR
Via Olgettina, 60
20132 Milano, IT**

72 Inventor/es: **Naldini, Luigi;
Amendola, Mario y
Vigna, Elisa**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 298 745 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

Promotores bidireccionales de síntesis y utilización de los mismos.

5 La presente invención se refiere a promotores bidireccionales que permiten una expresión eficaz y coordinada de dos o más genes, a vectores de transferencia génica que contienen a estos promotores, a partículas que transducen los citados vectores dentro de una célula, a la utilización de los citados vectores para la administración y la expresión de genes múltiples en células diana y también para la terapia génica y la fabricación de medicamentos.

10 **Estado de la técnica**

Para varias aplicaciones de transferencia y de terapia génica se requiere la expresión de transgenes múltiples dentro de las mismas células diana¹. La mejor forma de llevar a cabo los estudios de función génica es mediante la expresión de cADNs junto con un gen marcador; mediante este sistema, se pueden identificar y controlar *in vitro* e *in vivo* células modificadas genéticamente. De forma similar, las aplicaciones de la terapia génica se pueden mejorar mediante la purificación de células genéticamente corregidas antes de la administración *in vivo*, aprovechando la expresión coordinada de los marcadores selectivos. Las células modificadas genéticamente se pueden amplificar *ex vivo* o *in vivo* mediante la introducción de genes promotores del crecimiento o resistentes a fármacos junto con el gen terapéutico, tal como se mostró recientemente por medio de la selección mediante MGMT de Células Madre Hematopoyéticas transducidas (HSC)²; utilizando este sistema, se puede aumentar la eficacia de la terapia génica y su aplicación se puede extender potencialmente a un amplio espectro de enfermedades^{3,4}.

Por el contrario, las células modificadas genéticamente que expresan condicionalmente genes citotóxicos, junto con el gen terapéutico, se pueden eliminar *in vivo* si tienen lugar eventos adversos; este sistema se utiliza para controlar la enfermedad del injerto contra el huésped después de la infusión de linfocitos T de un donante para tratar una recaída de la leucemia⁵; este sistema también puede proporcionar una importante provisión de seguridad en la transferencia génica de HSC, dada la aparición reciente de leucemia relacionada con la integración del vector en un ensayo clínico con éxito de Inmunodeficiencia Combinada Grave ligada al cromosoma X⁶. La expresión coordinada de más de un transgen es esencial cuando la actividad que se va a reconstituir mediante transferencia génica depende de múltiples subunidades codificadas por genes diferentes, o requiere la sinergia de moléculas separadas. Por ejemplo, la reconstitución de la ruta biosintética de la dopamina en las neuronas estriadas de pacientes con la enfermedad de Parkinson requiere la coexpresión de la tirosina hidroxilasa con GTP-ciclohidrolasa I y/o con DOPA decarboxilasa⁷; la terapia génica del cáncer puede requerir la coexpresión de múltiples antígenos y/o citoquinas en células que presentan antígenos para inmunoterapia y la de dos cadenas de receptor de células T en células T diseñadas para la transferencia adoptiva⁸.

A pesar de dichas necesidades bien reconocidas, la obtención de un alto nivel de expresión, coordinado, de transgenes múltiples en la mayoría de las células diana ha sido un reto importante para la tecnología de transferencia génica. Mediante dos vectores diferentes se han expresado dos transgenes diferentes; sin embargo, solo una fracción de las células diana se transdujo por parte de ambos vectores y se obtuvo una población heterogénea de células que expresaban o uno o los dos genes en proporciones diferentes, impidiendo la realización de estudios fiables y/o de aplicaciones eficaces. De forma alternativa, se han expresado dos o más transgenes mediante promotores diferentes dentro del mismo vector⁹; no obstante, la distinta especificidad tisular y la interferencia mutua entre los promotores impedía con frecuencia la coexpresión eficaz en las mismas células diana¹⁰. El corte y empalme diferencial genera transcripciones múltiples del mismo promotor, aunque se ha probado que es difícil adaptarlo a la administración viral de transgenes múltiples¹¹. Se han generado poliproteínas químicas que se autoprocenan de forma cotranslacional en componentes separados utilizando el péptido de autocortado del Virus 2A de la Fiebre Aftosa^{12,13}; no obstante, hasta ahora la aplicación de esta tecnología a la transferencia de genes múltiples ha estado limitada porque requiere una ingeniería sofisticada, restringe ambas proteínas al mismo compartimento celular e introduce cambios en la secuencia que pueden afectar a la actividad, a la estabilidad y a la inmunogenicidad de la proteína.

Hasta ahora el sistema más satisfactorio para la transferencia de genes múltiples se ha apoyado en la utilización de los sitios internos de entrada al ribosoma (IRESs)¹⁴. Estas secuencias, identificadas en transcripciones virales y celulares, controlan la traducción de una forma independiente de la ^{ARNm}Cap y, cuando se insertan entre dos genes en un ARN mensajero bicistrónico, permiten la traducción del gen aguas abajo. Los autores pusieron a prueba el funcionamiento de diferentes IRESs en el contexto de vectores lentivirales (LVs) autoinactivantes (SIN) y descubrieron importantes limitaciones en este sistema.

60 El documento WO 02/064804 describe complejos de promotores duales bidireccionales que son eficaces para mejorar la actividad transcripcional de transgenes en plantas.

Los promotores bidireccionales de la invención incluyen una región potenciadora modificada con al menos dos promotores mínimos en cualquiera de los lados de la región potenciadora modificada situados en una orientación divergente. La solicitud se refiere a la expresión génica en plantas. Además, el sistema requiere la duplicación de secuencias del potenciador orientadas en tándem en una región interna modificada de la construcción, para unirse mediante dos promotores mínimos idénticos u homólogos en cualquiera de los dos lados. La presente invención no requiere la duplicación del potenciador ni ninguna otra secuencia en el promotor eficaz de la construcción bidireccional, ni se necesita que los promotores mínimos situados sobre cualquiera de los dos lados de la misma compartan

al menos el 30% de la identidad. Por último, la duplicación en tándem puede ser incompatible con la administración retro/lentiviral.

5 El documento US 6.388.170 da a conocer vectores de plantas, que tienen promotores bidireccionales, que comprenden un promotor mínimo y un promotor común, en los que los citados promotores mínimos están unidos de forma operable al citado promotor común, en orientación opuesta al citado promotor común y en el extremo 5' al citado promotor común. Las secuencias promotoras procedentes de plantas y de virus que infectan plantas se demuestra que son dnd probadas en células de plantas o en partes de plantas.

10 Dada la considerable distancia evolutiva que existe entre animales y plantas, el documento US 6.388.170 no enseña como diseñar promotores animales para actividad bidireccional, ni los promotores bidireccionales pueden trabajar de forma eficaz en células animales. Además, el documento US 6.388.170 no enseña como diseñar promotores bidireccionales para la expresión génica en animales ni en células de animales utilizando los procedimientos de transferencia génica disponibles.

15 El documento WO 01/34825 da a conocer líneas celulares, plásmidos y vectores útiles para la producción de virus recombinantes tales como adenovirus, que son útiles en la terapia génica. Las líneas celulares, los plásmidos y los vectores comprenden promotores inducibles, tales como promotores bidireccionales para la expresión coordinada de genes clonados bidireccionalmente. No obstante, solo se dan a conocer construcciones bidireccionales reguladas mediante Tet.

20 Así, los autores exploraron nuevas estrategias para aprovechar al máximo los sistemas de transferencia génica, tales como LV, que permiten una transducción *ex vivo* eficaz y una administración *in vivo* directa.

25 Descripción de la invención

Los autores han desarrollado un nuevo diseño de vector en el que mediaron promotores bidireccionales de síntesis en la transcripción coordinada de dos ARNs divergentes. Los autores demuestran que los LVs que llevan promotores bidireccionales expresaron de forma coordinada dos transgenes en la inmensa mayoría de las células transducidas, superando claramente a los vectores bicistrónicos. Se determinó el funcionamiento eficaz de los nuevos LVs bidireccionales en células hematopoyéticas primarias, ensayadas *ex vivo* y después de trasplante y en varios tejidos *in vivo*, después de la administración directa del vector o de transgénesis. La invención supera un antiguo obstáculo en la búsqueda de herramientas mejoradas para la expresión génica y se espera avanzar en el logro y en la seguridad de la terapia génica.

35 Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es un promotor bidireccional para la expresión de al menos dos secuencias codificantes en dirección opuesta en células animales que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

40 a) una primera secuencia promotora mínima procedente de genomas de citomegalovirus (CMV) o de virus de tumor mamario de ratón (MMTV);

b) una secuencia promotora completamente eficaz procedente de un gen animal;

45 conduciendo las dos secuencias promotoras a una transcripción coordinada de las citadas secuencias codificantes en orientación opuesta.

50 En el ámbito de la presente invención una secuencia promotora completamente eficaz significa una secuencia que conduce a una transcripción eficaz de la transcripción primaria. Preferentemente, ésta comprende una región potenciadora y una secuencia promotora mínima, diferenciada o solapada. Más preferentemente la secuencia promotora completamente eficaz procede de la fosfoglicerato quinasa o del promotor de la ubiquitina.

55 Es un objetivo de la invención un casete de expresión bidireccional que comprende esencialmente al promotor bidireccional tal como se describió anteriormente, sitios de inserción adecuados ubicados aguas abajo de cada promotor y sitios de poliadenilación ubicados aguas abajo de cada sitio de inserción.

60 Preferentemente el casete de expresión bidireccional comprende además al menos un elemento regulador post-transcripcional situado aguas arriba de uno o de cada sitio de poliadenilación. Más preferentemente el casete de expresión bidireccional comprende además al menos una secuencia de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para expresar tres o más genes.

Es un objetivo de la invención una construcción de expresión que contiene el promotor bidireccional, tal como se describió anteriormente.

65 Es un objetivo de la invención una construcción de expresión que contiene el casete de expresión bidireccional, tal como se describió anteriormente.

ES 2 298 745 T3

Es un objetivo de la invención un vector de expresión de transferencia génica que contiene la construcción de expresión tal como se describió anteriormente y que comprende además secuencias lentivirales o retrovirales.

5 Es un objetivo de la invención la utilización del vector de expresión de transferencia génica para la preparación de un sistema de administración y de expresión en células animales, preferentemente en células de tejido animal *in vivo*, más preferentemente neuronas cerebrales.

10 Es un objetivo de la invención un procedimiento *in vitro* para la expresión coordinada de dos secuencias codificantes exógenas dentro de una célula animal que comprende las siguientes etapas:

10 a) clonación de las citadas secuencias codificantes dentro del vector de expresión de transferencia génica, según la reivindicación 8, estando cada secuencia codificante bajo el control de uno de los dos promotores del promotor bidireccional;

15 b) transformación de células animales por medio de los citados vectores;

c) permitir la expresión del vector.

20 Preferentemente la célula animal es una célula humana, más preferentemente la célula humana es una célula humana retransplantable, incluso más preferentemente la célula humana retransplantable es una célula hematopoyética.

De forma alternativa, la transformación de células de tejidos *in vivo* se puede llevar a cabo mediante la administración directa del vector, tal como en neuronas cerebrales.

25 Es un objetivo de la invención un procedimiento para la generación de un organismo transgénico no humano que comprende la etapa de la transformación de células adecuadas por medio del vector de expresión de transferencia génica tal como se describió anteriormente.

30 Los vectores de la invención se pueden utilizar de forma ventajosa para estudios de función génica y de validación de dianas *in vitro* e *in vivo*; terapia génica; expresión de genes múltiples en células animales; generación de animales transgénicos y eventualmente para la destrucción de genes múltiples; y también para la fabricación de medicamentos.

Leyendas de las figuras

35 A continuación se describirá la invención haciendo referencia a las siguientes figuras:

Figura 1. Funcionamiento de la transferencia génica de vectores lentivirales bicistrónicos. (a) Esquema de la forma del vector proviral. Un casete bicistrónico de expresión que contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) procedente del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), con el sitio de inicio de la traducción de tipo natural (wt) o de tipo mutado (mut), o procedente del factor represor de NF-kB (NRF) sin traducir del extremo 5' de ARNm se activó por medio del citomegalovirus (CMV) humano de expresión precoz o mediante el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK). Regiones LTR ΔU3, R y U5, con delección en U3; SD y SA, sitio de acoplamiento de donante y de aceptor; Ψ, señal de encapsidación que incluye la porción 5' del gen gag (GA); RRE, elemento Rev-respuesta; cPPT, fragmento central de polipurina; WPRE, elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota. (b) Análisis de mediante la técnica de hibridación tipo Southern de células HeLa transducidas mediante los vectores monocistrónicos (CMV) o bicistrónicos indicados que expresaban luciferasa (gen 1) y GFP (gen 2) a partir del promotor de CMV, examinado para la secuencia del WPRE. Todos los vectores incorporaron la longitud esperada de ADN. La cantidad de copias del vector se determinó en relación con una curva estándar de plásmido y se utilizó para normalizar las poblaciones de vectores y para asegurar niveles de integración similares para cada vector en un tipo dado de célula diana en los experimentos mostrados en c-f. (c-f) Expresión de luciferasa y GFP en células HeLa humanas (c), células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC, d), linfocitos de la sangre periférica (PBL, e) y progenitores CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical (f) transducidos 5-7 días antes con un vector monocistrónico (□, CMV) o con el vector bicistrónico CMV-luciferasa-GFP que se indica. Columna de la izquierda, histogramas que representan la actividad neta de la luciferasa en extractos de células, media ± SD. Panel derecho, gráficos de puntos que representan la expresión de GFP mediante análisis FACS, se indica la frecuencia y la intensidad media de la fluorescencia (MFI, X) de las células GFP+. El vector monocistrónico de control expresó luciferasa en el histograma (□) y GFP en el gráfico de puntos que está situado más a la izquierda (CMV) para cada tipo de célula. (g, h) Análisis FACS de la expresión de ΔNGFR y GFP en células 293T (g) y en progenitores CD34+ (h) transducidos mediante un vector EMCV wt IRES que expresa ΔNGFR y GFP a partir del promotor PGK. Los histogramas situados en el panel (h) muestran la distribución de la expresión de ΔNGFR en todas las células viables analizadas (izquierda) y la distribución de la expresión de GFP en la células controladas (M1) ΔNGFR+ (derecha). Los experimentos mostrados son representativos de al menos tres experimentos llevados a cabo con resultados similares.

65 Figura 2. Funcionamiento de la transferencia génica de vectores lentivirales bidireccionales. (a) Esquema de la forma del vector proviral. Un promotor bidireccional fabricado mediante elementos de promotor mínimo a partir de citomegalovirus (mCMV) humano unido aguas arriba y en orientación opuesta a un promotor eficaz, procedente de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana o del gen UBI-C de la poliubiquitina, se condujo a la transcripción divergente de dos ARNs. CTE, elemento de transporte constitutivo a partir del virus del mono Mason-Pfizer; pA, sitio A de

poliadenilación del Virus Simio 40. Otras características del vector son tal como en la leyenda de la figura 1. (b) Actividad neta de la luciferasa y (c-e) expresión de GFP en células HeLa transducidas 5-7 días antes con LVs que llevaban los casetes de expresión bidireccional o de control que se indican. La frecuencia y la MFI (X) de las células GFP+ en el análisis FACS se indican a la derecha de los gráficos de puntos. La actividad de la luciferasa se determinó para los dos vectores marcados (□, ■). (f-j) Expresión de Δ NGFR y GFP en células HeLa transducidas 5-7 días antes con 10 diluciones en serie de LVs que llevaban el casete de expresión que se indica. Las frecuencias de las células Δ NGFR+ (región superior izquierda) y de las células doble positivo Δ NGFR/GFP (región superior derecha), con la MFI respectiva de Δ NGFR (Y) y de GFP (X), se indican en los gráficos de puntos FACS. Los experimentos mostrados son representativos de al menos tres experimentos llevados a cabo con resultados similares.

Figura 3. Comparación del funcionamiento de vectores bidireccionales y lentivirales bicistrónicos. Expresión de Δ NGFR y GFP en células 293T transducidas 3 semanas antes con 10 diluciones en serie de LVs que llevaban el casete de expresión que se indica. El porcentaje de células que expresan Δ NGFR y el de células doble positivo Δ NGFR/GFP (entre paréntesis) se indica encima de los gráficos de puntos FACS. En cada gráfico se indica la cantidad media de Copias del vector por Célula (CpC), con la frecuencia esperada de células transducidas expresada de acuerdo con la distribución de Poisson de sucesos independientes aleatorios. Aunque virtualmente todos los vectores integrados expresaron Δ NGFR, su nivel de expresión y la fracción de células transducidas que co-expresaban GFP fue mucho mayor para los dos vectores bidireccionales probados (MA1 y MA4) en comparación con el vector bicistrónico EMCV wt IRES.

Figura 4. Transferencia génica dual en células hematopoyéticas mediante vectores bidireccionales. (a-c) Se transdujeron progenitores CD34+ procedentes de sangre de cordón umbilical humano mediante el vector GFP- Δ NGFR MA1 en presencia de citoquinas de acción temprana tal como se describe²³ y se analizaron después de 7 días de cultivo en el mismo medio (a) y después de 10 días adicionales en un medio promotor de la diferenciación mieloide (b), o después de la siembra en medio clonogénico basado en metilcelulosa. Para (a) y (b) se muestra un gráfico de puntos que muestra expresión de Δ NGFR y GFP mediante el análisis FACS, junto con histogramas que muestran la distribución de la expresión de Δ NGFR en todas las células viables analizadas (parte superior) y la distribución de la expresión de GFP en las células controladas (M1) Δ NGFR+ (parte inferior). Se indica el porcentaje de progenitores inmaduros que en el momento del análisis expresan CD34 y el porcentaje de células diferenciadas que expresan el marcador mieloide CD 13. Para (c), se muestran micrografías representativas ópticas (izquierda) y fluorescentes (derecha) del tipo de CFC que se indica. (d, e) Se transdujeron linfocitos de sangre periférica humana después de una activación de 2 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (d), o después de 4 días de tratamiento con interleucina-7, tal como se describe²⁴, (e), y se analizaron para determinar la expresión de Δ NGFR y GFP tal como se describió anteriormente. (f, g) Se transdujeron progenitores de médula ósea purificada (lin-) de roedor sin estimulación con citoquina tal como se describe⁴⁸ y se analizó la expresión de Δ NGFR y GFP después de 7 días en un cultivo líquido (f), o se transplantaron de inmediato en recipientes singénicos irradiados letalmente. El análisis FACS de la sangre periférica de un ratón representativo 2 meses después del trasplante se muestra en g. Los experimentos mostrados son representativos de tres experimentos llevados a cabo con resultados similares. Para un análisis del funcionamiento más riguroso, en d-f se muestran las células transducidas para cantidades bajas de copias del vector.

Figura 5. Transferencia génica dual *in vivo* mediante vectores bidireccionales. Se inyectaron estereotácticamente GFP- Δ NGFR MA1 LV con un resultado de titulación elevado en el cuerpo estriado de ratones adultos. Dos meses después de la inyección se obtuvieron secciones criostáticas cerebrales y se analizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se muestran fotografías representativas del área inyectada, después de la inmunotinción para Δ NGFR (rojo), GFP (verde) y de la tinción con TO-PRO3 para el ADN nuclear (azul). Las señales fluorescentes se adquirieron de forma secuencial a partir de secciones ópticas individuales y se muestran individualmente y después de la combinación (combinación). Aumento original 200X (barra de escala = 120 μ m).

Figura 6. Transgénesis dual mediante vector bidireccional. Se generaron líneas de ratones transgénicos mediante inyección directa de GFP- Δ NGFR MA1 LV en el interior del espacio perivitelino de embriones de una célula, tal como se describe¹⁹ y en los tejidos que se indican se analizó la expresión de Δ NGFR (rojo) y GFP (verde) mediante microscopía de inmunofluorescencia y microscopía confocal en secciones criostáticas. Los núcleos se tiñeron con TO-PRO3 (azul). Las señales fluorescentes se adquirieron de forma secuencial a partir de secciones ópticas individuales y se muestran individualmente y después de la combinación (combinación). Las fotografías mostradas se obtuvieron para un ratón F1 que llevaba genomas de dos vectores integrados dentro de la línea germinal. Se obtuvieron fotografías similares a partir de otros ratones transgénicos analizados que llevaban una cantidad similar o mayor de copias de vectores. Aumento original 200X (bazo, pulmón), 400X (corazón, riñón, cerebro, hígado), 630X (intestino) (barra de escala = 120 μ m).

Figura 7a. Mapa del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral RRL-MA1-lucif/GFP.

Figura 7b. Secuencia del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral RRL-MA1-lucif/GFP.

Figura 8a. Mapa del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA1-GFP/deltaLNGFR.

Figura 8b. Secuencia del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA1-GFP/deltaLNGFR.

Figura 9a. Mapa del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral RRL-MA2-lucif/GFP.

ES 2 298 745 T3

Figura 9b. Secuencia del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral RRL-MA2-lucif/GFP.

Figura 10a. Mapa del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA3-GFP/deltaLNGFR.

5 Figura 10b. Secuencia del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA3-GFP/deltaLNGFR.

Figura 11a. Mapa del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA4-GFP/deltaLNGFR.

10 Figura 11b. Secuencia del plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA4-GFP/deltaLNGFR.

Ejemplo 1

15 *Materiales y procedimientos*

Construcción del plásmido

20 Todos los vectores de transferencia se construyeron a partir del plásmido pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP.WPRE utilizando los siguientes elementos de secuencia descritos anteriormente: EMCV IRESs con la secuencia codificante de genes situada aguas abajo iniciándose en el 11° ATG de IRES (wt) o con el 11° ATG de IRES mutado para crear un sitio de clonación HindIII y permitir el inicio de la traducción en el transgen situado aguas abajo ATG(EMCVmut), NRF IRES, MPMV CTE²¹, un promotor mínimo del CMV²⁰, un fragmento 1226 bp del promotor de la Ubiquitina-C.

25 *Construcción del vector lentiviral con promotores bidireccionales*

Para generar la construcción lentiviral RRL-MA1, se clonó un fragmento de XhoI-XhoI que contenía los elementos SV40polyA.CTE.Luciferasa.minhCMV (procedentes de la construcción lentiviral pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.minhCMV.TetO7.minMMTV.eGFP) en la construcción del vector lentiviral pRRL.sin.cPPT.hPGK.eGFP.Wpre (Follenzi y otros, 2000) cortada con la misma enzima para obtener RRL-MA1-lucif/GFP (pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.minhCMV.hPGK.eGFP.Wpre).

35 Para generar la construcción lentiviral CCL-MA1, se clonaron dos fragmentos en la construcción lentiviral pRRL.sin.cPPT.hPGK.ΔLNGFRWpre cortada primero con KpnI, truncada y a continuación cortada con XhoI, el primer fragmento que contenía los elementos minhCMV.eGFP se obtuvo a partir de la construcción lentiviral pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.minMMTV.TetO7.minhCMV.eGFP cortada con KpnI, truncada y a continuación cortada con XhoI y el segundo derivado se obtuvo a partir de la construcción pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.tTA2.Wpre cortada con BamHI, truncada y a continuación cortada con NotI. La construcción lentiviral resultante pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.minMMTV.TetO7.minhCMV.eGFP se cortó con NotI y con AvrII y el fragmento que contenía la construcción cPPT.SV40polyA.CTE.eGFP.minhCMV.hPGK.ΔLNGFRWpre se clonó en la construcción lentiviral pCCL.sin.cPPT.hPGK.eGFP.Wpre cortada con las mismas enzimas para obtener CCL-MA1-GFP/ΔLNGFR (pCCL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.eGFP.minhCMV.hPGK.ΔLNGFRWpre).

45 Para generar la construcción lentiviral RRL-MA2, se clonó un fragmento de HindIII-BamHI que contenía los elementos hFGK.Luciferasa (procedentes de la construcción del vector lentiviral pRRL.sin.cPPT.hPGK.Luciferasa.IRES.Wpre) en la construcción retroviral SF2-cLCM2G (obtenida de Rainer Loew, Universidad de Heidelberg, FRG) cortada con las mismas enzimas para obtener la construcción cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.hPGK.minMIVITV.eGFP. Esta construcción se cortó primero con SallI, se truncó y a continuación se cortó con BamHI y el fragmento que contenía los elementos Luciferasa.hPGK.minMMTV.eGFP se clonó en la construcción del vector lentiviral pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.tTA2.Wpre cortada de la misma forma, para obtener RRL-MA2-lucif/GFP (pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.hPGK.minMMTV.eGFP.Wpre).

55 Para generar la construcción lentiviral CCL-MA3, se clonaron dos fragmentos en pBLKS+ cortado con HindIII y con XhoI, el primer fragmento que contenía los elementos CTE.SV40polyA se obtuvo a partir de la construcción del vector lentiviral pRRL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.tTA2 cortada con HindIII y con XbaI y el segundo fragmento que contenía los elementos minMMTV.GFP se obtuvo a partir de la construcción cPPT.SV40polyA.CTE.Luciferasa.hPGK.minMMTV.eGFP cortada con XhoI y con XbaI para obtener la construcción pBLKS+ minMMTV.GFP.CTE.SV40polyA. La construcción resultante se cortó con EcoRV y con XhoI y el fragmento que contenía minMMTV.GFP.CTE.SV40polyA se clonó en la construcción del vector lentiviral pCCL.sin.cPPT.hPGK.ΔNGFR.Wpre cortada con las mismas enzimas, para obtener la construcción final del vector lentiviral CCL-MA3-GFP/ΔNGFR (pCCL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.GFP.minMMTV.hPGK.ΔNGFR.Wpre).

65 Para generar la construcción lentiviral CCL-MA4 el fragmento procedente de pHR'.UBI-C.eGFP cortado con PacI, truncado y cortado con PstI, que contenía la secuencia promotora de la UBI-C, se insertó en el lugar del promotor PGK en la construcción pCCL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.GFP.minCMV.PGK.ΔNGFR.Wpre cortada con EcoRV y con PstI para obtener la construcción final del vector lentiviral CCL-MA4-GFP/ΔNGFR (pCCL.sin.cPPT.SV40polyA.CTE.GFP.minCMV.UBI-C. ΔNGFR.Wpre).

ES 2 298 745 T3

Los mapas y las secuencias de nucleótidos de las construcciones RRL-MA1-lucif/GFP, CCL-MA1-GFP/ Δ LNGFR, RRL-MA2-lucif/GFF, CCL-MA3-GFP/ Δ LNGFR; CCL-MA4-GFP/ Δ LNGFR se muestran, respectivamente, en las figuras 7a-11a y en las figuras 7b-11b.

5 *Producción y titulación del vector*

Se produjeron LV de tercera generación pseudotipificados con VSV mediante la cotransfección transitoria de 4 plásmidos en células 293T y se purificaron mediante ultracentrifugación tal como se describe¹⁵, con la modificación de que para la recolección del vector se añadió Butirato de Na 1 mM a los cultivos⁴⁷. Los resultados de las titulaciones de la expresión de los vectores GFP o Δ LNGFR se estimaron en células HeLa mediante dilución límite. Las partículas del vector se midieron mediante inmunocaptura con el antígeno p24 de la región gag del HIV-1 (NEN Life Science Products). La infectividad del vector se calculó como la proporción entre el resultado de la titulación y el de las partículas medidas para el vector que expresa GFP o Δ LNGFR. El resultado de la titulación de la expresión del vector en el sobrenadante de 293T varió entre 0,7 y 1×10^7 Unidades de Transducción^{HeLa}(TU)/ml para el vector CMV o PGK monocistrónico, entre 3 y 8×10^6 TU/ml para vectores bicistrónicos y para vectores bidireccionales. La infectividad del vector varió entre 0,5 y 1×10^5 TU/ng de p24 para el vector CMV o PGK monocistrónico y entre 2 y 6×10^4 TU/ng de p24 para los vectores bicistrónicos y bidireccionales.

20 *Cultivos celulares*

Se mantuvieron cultivos continuos de células HeLa y 293T en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Sigma, Milán, Italia) suplementados con suero bovino fetal al 10% (FBS; Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido) y con una combinación de penicilina-estreptomicina y glutamina. Se obtuvieron cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical humana (HCTVECs), linfocitos de la sangre periférica y progenitores CD34+ procedentes de sangre de cordón umbilical humano y se mantuvieron tal como se describe¹⁵. Se transdujeron progenitores CD34+ con 5×10^7 TU/ml de LV y se cultivaron durante al menos 7 días en presencia de interleucina 6 humana recombinante (rhIL6, 20 ng/ml), factor recombinante de célula madre humana (rhSCF, 100 ng/ml), ligando FLT-3 humano recombinante (ligando rhFLT-3, 100 ng/ml), procedentes todos de PeproTech (Rocky Hill, NJ) y trombopoyetina humana recombinante (rhTPO, 20 ng/ml; Amgen, Thousand Oaks, CA) tal como se describe²³. Para la diferenciación de las condiciones, se cultivaron progenitores transducidos durante 10 días en presencia de rhSCF, 50 ng/ml, factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos humanos recombinantes (rhGM-CSF, 20 ng/ml) y factor estimulante de colonias de monocitos humanos recombinantes (rhG-CSF, 20 ng/ml), todos ellos procedentes de PeproTech. Para las pruebas clonogénicas, se recubrieron células transducidas con una densidad de 800 células/ml en medio MethoCult humano completo (StemCell Technologies, Vancouver, CA) y se sometieron a conteo mediante microscopía óptica y por fluorescencia 14 días después.

Se purificaron linfocitos de sangre periférica humana mediante gradiente de Ficoll y se transdujeron con 0,5-5 $\times 10^7$ TU/ml de vector después de 2 días de activación con 30 ng/ml de anticuerpos anti-CD3 (Orthoclone, Milán, Italia) mas 1 μ g/ml de anticuerpos anti-CD28 (PharMingen, San Diego, CA), o después de 4 días de tratamiento con 5 ng/ml de interleucina-7 (Boehringer Mannheim-Roche GmbH, Mannheim, Alemania), tal como se describe²⁴.

La purificación de la línea de células con marcador negativo de médula ósea de ratón C57BL/6 con una técnica magnética de agotamiento celular (StemCell Technologies, Vancouver, CA), la transducción *ex vivo* en medio StemSpan libre de suero (StemCell Technologies, Vancouver, CA) con $0,5-2 \times 10^7$ TU/ml de vector y el trasplante en recipientes singénicos irradiados letalmente se llevaron a cabo tal como se describe.

45 *Ratones*

Se adquirieron ratones CD1, C57BL/6 y FVB a Charles Rivers Laboratories (Calco, Italia) y se mantuvieron en condiciones SPF. Todos los procedimientos animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y la Utilización de Animales del Hospital San Raffaele.

Análisis del ADN: Técnica de hibridación tipo Southern y PCR en tiempo real

Las copias del vector por genoma se cuantificaron mediante PCR en tiempo real a partir de 300 ng de cadena de ADN molde extraídos de células mediante un kit comercial (Qiagen), que utiliza un conjunto de cebadores y de sondas para detectar la columna vertebral del LV:

Cebador del LV hacia adelante, 5'-TGAAAGCGAAAGGGAAACCA-3';

60 Cebador del LV hacia atrás, 5'-CCGTGCGCGCTTCAG-3';

Sonda del LV, 5'-(VIC)-CTCTCTCGACGCAGGACT-(TAMRA)-3'.

Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizaron utilizando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (PE-Applied Biosystem). Para la técnica de hibridación tipo Southern, se extrajo ADN de células transducidas, se digirió con Afl-II para liberar el casete de expresión del ADN del vector integrado y se analizó con una sonda WPRE para detectar las secuencias del vector. La cantidad media de copias integradas del vector se determinó en relación con una curva estándar de plásmido.

ES 2 298 745 T3

Esas cantidades se utilizaron para calcular el resultado de la titulación de la integración del vector y normalizar las poblaciones de vectores para todos los experimentos posteriores de transducción, para asegurar niveles similares de integración para cada vector ensayado.

5 *Diseño Experimental e Inyección Estereotáctica*

Se anestesiaron ratones C57BL/6 de nueve semanas de edad con una inyección por vía intraperitoneal de Tri-bromoetanol al 1,25% (SIGMA), se situaron en un marco estereotáctico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) y mediante una pequeña incisión se expuso el cráneo. Se inyectaron dos μl de concentrado de vector ($2 \times 10^6 \text{ TU}/\mu\text{l}$)
10 mediante una jeringa Hamilton con una aguja de punta truncada 33G (Hamilton, Reno, NV) en el hemisferio izquierdo del cuerpo estriado (coordenadas estereotácticas en mm desde el bregma: AP=+0,74, ML=-1,9 y DV=-3,5 desde la superficie del cráneo) a una velocidad de 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$. La aguja se dejó en su lugar durante 5 minutos más antes de retirarla lentamente.

15 *Transgénesis*

Se generaron ratones transgénicos utilizando LV tal como describieron Lois y otros¹⁹. En síntesis, se sometieron a superovulación ratones FVB hembra con una combinación de suero de yegua preñada y gonadotropina coriónica humana. Por término medio se recogieron entre 20 y 30 embriones por cada hembra y en el mismo día se les microin-
20 yectaron a los embriones dentro del espacio perivitelino 10-100 pL de disolución de LV con una concentración de $5 \times 10^7 \text{ TU}/\text{ml}$. Los embriones manipulados se implantaron de inmediato dentro del oviducto de ratonas CD1 pseudopreñadas. Las crías se clasificaron según su genotipo por la presencia de la secuencia GFP mediante análisis PCR tal como se describe⁴⁹. Los ratones positivos se reprodujeron para poner a prueba la transmisión de la línea germinal del transgen. Se extrajo ADN de la cola y se utilizó para cuantificar el número de copias del vector mediante PCR en
25 tiempo real en los ratones fundadores y en los ratones F1 descendientes.

Citometría de flujo y ensayo Luciferasa

Las células transducidas se cultivaron durante al menos 4 días antes de realizar el análisis FACS para que alcanzasen
30 el estado estacionario de la expresión de GFP y para descartar la pseudotransducción. Antes del análisis FACS, se desprendieron células adherentes con una disolución de 0,05% tripsina-EDTA, se lavaron y se fijaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía paraformaldehído (PFA) al 1% y FBS al 2%. Células cultivadas en suspensión se lavaron y se pusieron de nuevo en suspensión en PBS que contenía 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (IP) (BD Bioscience PharMingen, San Diego, CA) y FBS al 2%. Para la inmunotinción, se bloquearon 10^5 células en suero
35 de ratón con PBS al 5%, suero humano al 5%, FBS al 2% durante 15 min a 4°C. Después del bloqueo, se añadieron 10 μl de anticuerpos (anti-CD34 y anti-CD13, Dako, Glostrup, Dinamarca y anti- ΔLNGFR , BD Bioscience PharMingen, San Diego, CA) conjugados con R-ficoeritrina (RPE) y las células se incubaron durante 30 min a 4°C, se lavaron, se tiñeron con IP y se analizaron mediante citometría de flujo con analizador de tres colores. Para el análisis sólo se utilizaron células viables, IP negativas.
40

La luciferasa se ensayó en lisatos celulares preparados tal como describe el fabricante (sistema de ensayo de luciferasa, Promega). Las URL se midieron con un luminómetro Lumat LB9507 (Berthold) después de mezclar los lisatos celulares (normalizados para el contenido de proteína medido mediante el sistema BCA Protein Assay Reagent kit de Pierce) con Sustrato de Luciferasa (Promega).
45

Análisis del tejido

Ratones anestesiados se perfundieron con NaCl al 0,9% seguido de PFA al 4% en PBS. Se recogieron muestras de tejido, se equilibraron en sacarosa al 20% en PBS durante 48 h a 4°C y se embebieron en un compuesto de temperatura de corte óptima (TCO) para un enfriamiento rápido. Se incorporaron en PFA secciones criostáticas con un espesor de 10 μm (para ratones transgénicos) y de 20 μm (para ratones inyectados en el marco estereotáctico) y se congelaron a -80°C. Las secciones se bloquearon con suero de cabra al 5% (Vector Laboratories) en PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% y Triton X-100 (PBS-T) al 0,1% y se incubaron con anticuerpos GFP de conejo purificados por afinidad (Molecular Probes) y con anticuerpos monoclonales ΔLNGFR conjugados con R-ficoeritrina (RPE) (BD Bioscience PharMingen, San Diego, CA) durante 1 h, se lavaron y se tiñeron con anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con AlexaFluor488 (Molecular Probes) en PBS-T y en BSA al 1% durante 1 h. Los núcleos celulares se tiñeron con TOPRO-3 después de 1 h de tratamiento con ARNasa (Molecular Probes). Las secciones se montaron y se analizaron mediante un microscopio láser confocal con tres fuentes de láser (Radiance 2100; BioRad). Se adquirieron de forma secuencial señales fluorescentes a partir de secciones ópticas individuales y se analizaron mediante
60 PhotoShop 7.0 (Adobe).

Resultados

LVs bicistrónicos

65 A efectos de expresar más de un transgen a partir de un vector individual, los autores evaluaron primero el funcionamiento de diferentes IRESs en el contexto de LVs autoinactivantes de última generación¹⁵. Los autores utilizaron los promotores fuertes de CMV y de PGK para conducir a la expresión de transcripciones bicistrónicas que codifiquen,

entre el extremo 5' y el extremo 3', el indicador de la luciferasa, un IRES y el marcador GFP asociado a las células (figura 1a). A partir del virus de la Encefalomiocarditis se obtuvieron dos IRESs; una forma natural (EMCVwt) y una forma mutante (EMCVmut), que se diferenciaban en el ATG desde el que se inició la traducción aguas abajo. A partir de la secuencia sin traducir del extremo 5' de ARNm del Factor Represor de la transcripción de NF- κ B (NRF)¹⁸ se obtuvo otro IRES.

Los autores generaron poblaciones pseudotificadas con VSV con resultados de titulación elevados de todos los vectores bicistrónicos y monocistrónicos de control y las normalizaron para la medida de la actividad de transducción en células HeLa mediante la técnica de hibridación tipo Southern (figura 1b). A continuación compararon la expresión génica en células transducidas hasta cantidades iguales de copias del vector (figuras 1c-f). Aunque la actividad de la luciferasa fue similar en las células HeLa transducidas con el vector CMV-luciferasa y en células transducidas mediante el vector bicistrónico que tiene el mejor funcionamiento, solo una pequeña fracción de las últimas células expresaron el gen GFP dependiente del IRES, con una reducción de 10 veces en el resultado de la titulación de la expresión en comparación con células transducidas mediante el vector de control CMV-GFP (figura 1c). Además, la intensidad media de la fluorescencia (MFI) del GFP fue significativamente menor en las células que expresaban la proteína a partir de los IRESs que en las células que la expresaban a partir del ^{ARNm}Cap. A continuación los autores ensayaron LVs bicistrónicos en células primarias humanas, que incluían células endoteliales de la vena umbilical, linfocitos de la sangre periférica y progenitores CD34+ hematopoyéticos procedentes de sangre de cordón umbilical (HPC) (figura 1d-f). Todos los tipos de células se transdujeron de forma eficaz, tal como se indicó mediante la frecuencia de células positivas para GFP en cultivos transducidos mediante el vector de control CMV-GFP, aunque la expresión de GFP dependiente del IRES solo se observó en una fracción de las células transducidas mediante vectores bicistrónicos. La actividad del IRES varió ampliamente con el tipo de célula diana; el IRES del NRF fue el único que alcanzó una expresión génica en linfocitos detectable aguas abajo, mientras que el IRES del EMCVwt fue el más eficaz en los otros tipos de células. Además, todos los IRESs se redujeron, en algunos casos más de un log, aguas arriba de la expresión génica, en comparación con el vector de control CMV-luciferasa.

También evaluaron los vectores basados en IRES mediante la expresión de dos marcadores asociados a las células, GFP y una versión truncada del receptor NGF de baja afinidad (Δ LNNGFR) (figura 1g, h). Entre las células HeLa transducidas por medio de una dosis baja del vector bicistrónico que mostró el mejor funcionamiento, solo las células que expresaban altos niveles de Δ LNNGFR expresaban también GFP, con una media de una entre cuatro células positivas para Δ LNNGFR que expresaban GFP hasta niveles detectables (figura 1g). De forma similar, solo una pequeña fracción de progenitores CD34+ transducidos que expresaban Δ NGFR expresaban también GFP hasta niveles detectables (figura 1h). En general, estos resultados indicaban que los vectores bicistrónicos basados en IRES fracasaron en asegurar la expresión coordinada de dos transgenes en la mayoría de las células diana ensayadas, e indicaban que para obtener una población que expresase ambos transgenes en la mayoría de las células se requerían la transducción de multicopias o la selección de células transducidas para la expresión génica aguas abajo.

LVs bidireccionales

Para superar las limitaciones de los vectores bicistrónicos, los autores exploraron un nuevo diseño de promotor para la expresión coordinada de transgenes. Unieron un promotor mínimo aguas arriba, y en orientación opuesta, a un promotor eficaz. La razón fundamental de este diseño fue que los elementos situados aguas arriba en el promotor eficaz, cuando se encuentran flanqueados estrechamente por promotores mínimos a ambos lados, pueden conducir a actividad transcripcional en ambas direcciones. Si tuviese lugar dicha activación bidireccional, la expresión de ambas transcripciones se regularía de forma coordinada. Los autores ensayaron dos promotores expresados ubícuamente, que anteriormente habían mostrado que conducían a una expresión de transgenes robusta y eficaz en LV; el fragmento 516 bp mencionado anteriormente procedente del promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana y un fragmento 1226 bp procedente del promotor de la ubiquitina C (UBI C)¹⁹ humana. Los unieron a un promotor mínimo procedente del citomegalovirus (minCMV) que se había desarrollado anteriormente para iniciar el acoplamiento de la transcripción eucariótica a operadores²⁰ dependientes de la tetraciclina (Tc). Flanquearon el promotor bidireccional con dos casetes de expresión optimizados para la administración de genes mediada por LV (figura 2a). El casete situado aguas arriba -con orientación en sentido contrario en relación con el vector LTR- incluía al elemento de transporte constitutivo (CTE) del virus del mono Mason-Pfizer²¹ y un sitio de poliadenilación para el Virus Simio 40 (SV40). El casete situado aguas abajo incluía el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE)²² y el sitio de poliadenilación SIN HIV-1 LTR.

Tal como se describió anteriormente para los LVs bicistrónicos, los autores verificaron la correcta transferencia y la transducción normalizada de cada vector por medio del análisis de la técnica de hibridación tipo Southern y mediante PCR en tiempo real de células transducidas. Se produjeron LVs que llevaban casetes de expresión bidireccional con resultados de titulación e infectividad elevados, similares a los obtenidos con los vectores estándar (véase Procedimientos). El diseño bidireccional mejoró de forma significativa la transcripción del promotor mínimo situado aguas abajo sin afectar a la expresión del promotor eficaz situado aguas arriba (figura 2b-h). La expresión de luciferasa a partir del promotor minCMV, por ejemplo, se incrementó en al menos un log cuando se fundió aguas arriba al promotor PGK (figura 2b). De forma notable, el promotor PGK bidireccional permitió la detección de GFP (o de Δ LNNGFR, no mostrado) en la misma frecuencia y hasta niveles de expresión similares en células transducidas mediante el vector bidireccional y permitió la expresión de la proteína desde cualquiera de los lados del promotor (figura 2c, d), tal como en células transducidas mediante el vector PGK de control (figura 2e). Utilizando dos marcadores asociados a las células, Δ LNNGFR y GFP, los autores evidenciaron la expresión estable, eficaz y coordinada de LVs bidireccionales,

tanto con cantidades de copias de vectores altas como con cantidades bajas (figura 2f). Con una aportación alta de vectores, alcanzaban un alto nivel de expresión de ambos transgenes en virtualmente todas las células diana. Con una aportación baja de vectores, cuando la mayoría de las células transducidas portaban una copia proviral, evidenciaron la coexpresión de transgenes en virtualmente todas las células marcadas, lo que indicaba la existencia de transcripción divergente desde el promotor bidireccional. En ambas condiciones, la expresión de transgenes se mantuvo en niveles similares en las células analizadas en los momentos iniciales y finales después de la transcripción (no mostrado y parte inferior de la figura 3). Las células que expresaban transgenes tendían a distribuirse a lo largo de una línea diagonal en el gráfico FACS de dos colores, lo que indicaba que la expresión de los dos transgenes estaba regulada de forma coordinada.

De forma curiosa, los autores observaron la expresión bidireccional coordinada, aunque en un nivel de eficacia significativamente más bajo en el lado situado aguas arriba en comparación con el lado situado aguas abajo, cuando ensayaron solo el promotor PGK en el contexto del casete de expresión bidireccional que habían desarrollado (figura 2g). Reprodujeron este resultado después de intercambiar la posición de los dos transgenes en cada uno de los lados del promotor PGK (no mostrado). Estos resultados indicaban que los elementos que activaban la transcripción en el promotor PGK son intrínsecamente capaces de desencadenar la transcripción divergente y así proporcionar la fuerza impulsora principal para la expresión dual de genes en el nuevo LV, asegurando la regulación coordinada de la transcripción en ambos lados del promotor bidireccional. La adición del promotor mínimo minCMV, que de por sí tenía una actividad muy baja (figura 2h y parte superior de la figura 2b), mejoró la transcripción aguas arriba desde el promotor PGK posiblemente debido a un inicio más eficaz (compare la figura 2g y la 2f). Cuando los autores cambiaron el promotor conductor en vectores bidireccionales desde PGC hasta UBI-C, reprodujeron los resultados observados con el promotor PGK (figura 2i). Revelaron una actividad bidireccional intrínseca del promotor de la UBI-C (figura 2j) que se mejoraba de forma significativa mediante la adición aguas arriba del promotor minCMV.

A continuación los autores compararon directamente el funcionamiento de vectores bidireccionales y bicistrónicos en relación con la cantidad de copias integradas, tal como se mide mediante PCR en tiempo real (figura 3). Mediante el análisis de células 293T transducidas con dosis crecientes de vector, probaron que la inmensa mayoría de los vectores bidireccionales integrados basados en el promotor PGK (MA1) o en el UBI-C (MA4) expresaban de forma eficaz ambos transgenes, superando claramente al mejor vector bicistrónico basado en IRES.

Transferencia Génica Dual Ex Vivo e In Vivo

A continuación los autores evaluaron el funcionamiento del MA1 LV bidireccional en dianas más relevantes para las aplicaciones de la terapia génica y mediante distintas estrategias de administración. Transdujeron HPC y PBL de sangre de cordón umbilical humano con Δ LNGFR-GFP MA1 LV *ex vivo*, de acuerdo con los protocolos anteriormente optimizados^{23,24} (figura 4). Ambos productos génicos se expresaron de forma coordinada hasta niveles elevados en una gran fracción de HPC marcados ambos como células inmaduras cultivadas en presencia de citoquinas de acción temprana (figura 4a) y después de la diferenciación en cultivo líquido (figura 4b) o de prueba clonogénica (figura 4c, solo GFP). De forma similar, obtuvieron la expresión coordinada de Δ LNGFR y GFP en PBL transducido en condiciones estándar de proliferación, iniciada mediante la co-estimulación con CD3/CD28 (figura 4d) y células no proliferantes, tratadas solo con IL-7 para mantener las propiedades de las células naïve (figura 4e). También llevaron a cabo estudios de trasplantes con HPC de roedor transducida, enriquecida a partir de médula ósea mediante selección negativa, para probar la expresión transgénica dual y estable en la repoblación a largo plazo de HSC en la progenie (figura 4f). Los Δ LNGFR y GFP se expresaron de forma coordinada en niveles similares en las células transducidas *ex vivo*, antes del trasplante y en los leucocitos de ratones injertados a largo plazo. En general, estos resultados validaron el nuevo LV para una transferencia génica dual muy competente en células hematopoyéticas primitivas, precursoras y diferenciadas.

Inyectaron Δ LNGFR-GFP MA1 LV concentrado en el cuerpo estriado de ratones adultos y determinaron la puntuación de la expresión de transgenes 4 semanas después de la inyección mediante microscopía confocal de secciones del cerebro inmunoteñidas para GFP y Δ LNGFR (figura 5). Observaron la coexpresión robusta de ambos transgenes en el tejido del cerebro que rodeaba el lugar de la inyección. Tal como se informó anteriormente después de la inyección de LV²⁵⁻²⁷ pseudotipificado con VSV en el cuerpo estriado, la inmensa mayoría de las células que expresaban los marcadores tenían la morfología típica de las neuronas estriadas. Así, el nuevo LV bidireccional permitió una transferencia génica dual eficaz *in vivo*.

Transgénesis Dual

Los autores evaluaron si el nuevo LV bidireccional permitía la generación de líneas duales de ratones transgénicos. Tal como describieron anteriormente Lois y otros¹⁹, inyectaron el Δ LNGFR-GFP LV dentro del espacio perivitelino de embriones de una célula única y los implantaron dentro de hembras pseudopreñadas. Se obtuvieron ratones transgénicos con una frecuencia elevada, tal como evaluamos mediante la presencia de ADN del vector (más del 50% de los neonatos), y probamos la integración del vector en la línea germinal por medio del cruce de algunos ratones fundadores y mediante el análisis del contenido de ADN del vector en su progenie y el análisis de la expresión de transgenes (figura 6). En los dos ratones F1 analizados, que llevaban las copias 2 y 5 del vector en el genoma, los autores encontraron una expresión notablemente coherente de ambos transgenes en virtualmente cada célula de los tejidos estudiados, que incluían cerebro, hígado, bazo, intestino, corazón, músculo esquelético y riñón. La expresión del vector también se detectó bien en la médula ósea y en la sangre periférica de los mismos ratones, aunque en menos del

100% de las células y más claramente para Δ NGFR que para GFP (no mostrado). Estos datos indicaban que la transgénesis bidireccional mediante el LV es un procedimiento rápido y eficaz para obtener la expresión robusta, estable y coordinada de dos transgenes en ratones diseñados genéticamente. Además, los autores evidenciaron que el promotor bidireccional minCMV-PGK que habían desarrollado controla la expresión dual de los transgenes en la mayoría de los tejidos diferenciados del ratón y mantiene la expresión después de la herencia a través de la línea germinal.

Discusión

En la búsqueda de estrategias que permitan una transferencia génica dual eficaz, los autores inicialmente se enfrentaron a las importantes limitaciones de los sistemas basados en IRES. Cuando se ensayó en el contexto de LV bicistrónico, la expresión génica dependiente de IRES era significativamente más baja que la que dependía del ^{ARNm}Cap y requería la transducción de multi-copias para la coexpresión del gen aguas abajo en una fracción grande de las células transducidas. Además, los IRESs reducían la expresión de los genes aguas arriba en la transcripción y mostraban una variación importante en su actividad que era dependiente del tipo de célula. Se han informado limitaciones similares cuando se incorporan IRESs dentro de otros tipos de vectores de transferencia génica^{14,28-32}. Así, es probable que se requiera la selección para la expresión génica aguas abajo cuando se utilice IRES para asegurar la coexpresión en todas las células diana. Aunque los protocolos de selección son compatibles con algunas transferencias génicas *ex vivo* y con algunas aplicaciones de la terapia génica, éstos pueden afectar de forma negativa a las propiedades biológicas de las células corregidas genéticamente, en particular cuando la expresión del marcador seleccionable es ineficaz. De hecho, el cultivo prolongado *ex vivo* y una composición de tamaño limitado o clonal de la población de células transducidas pueden reducir el injerto, la supervivencia a largo plazo y la repoblación del tejido después del trasplante³³. De forma incluso más importante, la ineficacia de la expresión dependiente de IRES impide la mayoría de las aplicaciones de vectores bicistrónicos en la transferencia génica directa *in vivo*. Así, los autores exploraron nuevas estrategias para aprovechar al máximo los sistemas de transferencia génica, tales como LV, que permiten una transducción *ex vivo* eficaz y una administración *in vivo* directa³⁴.

Los autores han desarrollado un nuevo diseño de promotor basado en la yuxtaposición de elementos de promotor mínimo aguas arriba, y en orientación opuesta, a un promotor eficaz. El ensamblaje bidireccional condujo a la transcripción divergente, lo que indicaba que los elementos potenciadores/promotores situados aguas arriba dentro del promotor eficaz eran capaces de promover la transcripción de una forma independiente de la orientación y desde ambos lados de forma simultánea. Tras la incorporación de estos promotores dentro del LV, alcanzaron la transferencia génica dual eficaz y la expresión coordinada en líneas celulares continuas y en células primarias *ex vivo*. Debido a que en la inmensa mayoría de las células transducidas se expresaron ambos transgenes, los autores no necesitaron seleccionar células para asegurar la coexpresión de los transgenes. Tras la inyección directa del LV bidireccional dentro del SNC, los autores evidenciaron la expresión coordinada de dos transgenes en células neuronales *in vivo*. Además, el LV bidireccional permitió una transgénesis dual robusta, lo que condujo a la expresión de todas las células de ambos transgenes en todos los tejidos examinados. Todos estos resultados no se habían podido alcanzar hasta ahora utilizando las tecnologías disponibles en la actualidad.

Mediante el seguimiento de las células transducidas que portaban una copia individual del vector, los autores probaron que tenía lugar la transcripción divergente desde un promotor bidireccional individual, que la expresión de ambos transgenes estaba ligada funcionalmente y regulada de forma coordinada y probaron que los promotores bidireccionales eran activos de forma coherente en todos los tipos de células diana ensayados, sin ser silenciados o fijados de forma aleatoria en una dirección de la transcripción, incluso después de la diferenciación celular. Aunque no acotaron cuán cerca deben estar los dos promotores mínimos opuestos para que tenga lugar la unión funcional, los autores pueden prever que se pueda requerir la yuxtaposición íntima del promotor mínimo fusionado a alguno de los elementos situados aguas arriba en el promotor eficaz, tal como se observa en promotores naturales entre elementos mínimos y elementos situados aguas arriba. Tanto los promotores PGK como los UBI-C ensayados en este trabajo condujeron a transcripción divergente cuando se fusionaron a un promotor mínimo en la orientación opuesta. De forma curiosa, se evidenció que ambos promotores eran intrínsecamente capaces de promover la transcripción divergente, aunque con una eficacia más baja en el lado situado aguas arriba que en el lado situado aguas abajo, cuando se incorporaban dentro del casete de expresión bidireccional que habían desarrollado los autores. Esta sorprendente observación puede indicar una característica específica de un tipo de promotores de mantenimiento expresados ubicuamente, posiblemente relacionada con su contenido de islas CpG (véase a continuación y ³⁵⁻³⁷). No obstante, los autores no deberían olvidar que tanto la ubicación del promotor entre dos casetes de expresión eficaces dotados con elementos reguladores post-transcripcionales que mejoran la traducción, como la integración mediada por LV, que se ha evidenciado que se centra preferentemente en genes transcritos diana en la cromatina, pueden contribuir a descifrar la actividad transcripcional latente. Aunque la actividad bidireccional intrínseca de los promotores de mantenimiento ensayados puede no ser lo suficientemente eficaz para su aprovechamiento de por sí, sin el ensamblaje de los elementos de promotor mínimo aguas arriba descrito en este trabajo, ésta proporciona la base para la regulación coordinada de la expresión dual de genes lograda por nuestros nuevos vectores. Por otra parte, se debería tener en cuenta la predisposición de estos promotores para conducir a la transcripción divergente cuando se diseñen vectores y cuando se analicen células o tejidos transducidos³⁸ y pueden proporcionar un posible mecanismo para la interferencia observada con frecuencia entre promotores cercanos en la misma construcción de vector. Es posible que el diseño bidireccional aquí descrito se pueda aplicar con éxito en promotores específicos de tejidos para obtener la expresión coordinada de dos transgenes en tejidos específicos. Además, mediante la combinación de promotores bidireccionales con transcripciones bicistrónicas se pueden expresar más de dos transgenes dentro de la misma célula, aunque con las limitaciones descritas anteriormente para los vectores que dependen de IRES.

Los promotores bidireccionales inducibles se desarrollaron originalmente en sistemas de expresión regulados mediante Tet, por medio de la duplicación de un promotor mínimo en ambos lados de una serie de repeticiones del operador Tet, para obtener la expresión regulada de forma exógena de dos transgenes^{36,40,41}. Este diseño se aplicó recientemente a otros sistemas que también combinan elementos potenciadores procarióticos con transactivadores quiméricos para regular la expresión génica⁴². Aunque estos sistemas de expresión inducibles representan herramientas poderosas para los estudios de la función génica, dependen de la coexpresión y de la actividad funcional de transactivadores de proteínas y presentan varios desafíos cuando se aplican a la administración basada en vectores y a aplicaciones *in vivo*. Recientemente se ensayó un promotor bidireccional constitutivo para la expresión de genes exógenos en biotecnología vegetal⁴³. Los resultados de los inventores proporcionan la primera descripción de promotores bidireccionales de síntesis que aprovechan los sistemas transcripcionales endógenos disponibles para la mayoría de los tipos de células animales para conducir a una expresión robusta y constitutiva de dos transcripciones divergentes. De hecho, hasta hace poco se habían documentado pocos ejemplos de promotores bidireccionales. De forma curiosa, un informe reciente del genoma humano indicó una abundancia de pares de genes transcritos de forma divergente, cuyos sitios de inicio para la transcripción se encuentran separados por menos de 1 kb. Es probable que muchos de los elementos del promotor encontrados entre estos pares de genes puedan iniciar la transcripción en ambas direcciones y puedan contener elementos compartidos que regulen ambos genes⁴⁶. Así, los promotores bidireccionales de síntesis que han desarrollado pueden copiar una característica bien representada y evolutiva conservada de la transcripción eucariótica, lo que proporciona una base estructural para su robusto funcionamiento. Los nuevos vectores lentivirales construidos alrededor de estos promotores bidireccionales probablemente harán progresar el alcance y la seguridad de la terapia génica, el poder de la función génica y de los estudios de validación de dianas y las aplicaciones de la transgénesis animal. Si se adaptan para la expresión de ARN interferente pequeño, también pueden permitir la destrucción coordinada de genes múltiples.

Bibliografía

1. Kay, M.A., Glorioso, J.C. y Naldini, L. *Nat Med* 7, 33-40 (2001).
2. Neff, T. y otros. *J Clin Invest* 112, 1581-1588 (2003).
3. Bordignon, C. y Roncarolo, M.G. *Nat. Immunol.* 3, 318-321 (2002).
4. Sadelain, M. *J Gene Med* 4, 113-121 (2002).
5. Bonini, C. y otros. *Science* 276, 1719-1724 (1997).
6. Haccin-Bey-Abina, S. y otros. *Science* 302, 415-419 (2003).
7. Burton, E.A., Glorioso, J.C. y Fink, D.J. *Gene Ther* 10, 1721-1727 (2003).
8. Sadelain, M., Riviere, I. y Brentjens, R. *Nat Rev Cancer* 3, 35-45 (2003).
9. Miller, A.D. en *Retroviruses*. (eds. J. Coffin, S.H. Hughes y H.E. Varmus) 437-474 (*Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview; 2000).
10. Emerman, M. y Temin, H.M. *Mol Cell Biol* 6, 792-800 (1986).
11. Zhu, Y. y otros. *Mol. Ther.* 4, 375-382 (2001).
12. Klump, H. y otros. *Gene Ther.* 8, 811-817 (2001).
13. Furler, S. y otros. *Gene Ther* 8, 864-873 (2001).
14. Martinez-Salas, E. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 458-464 (1999).
15. Follenzi, A. y otros. *Nat Genet* 25, 217-222 (2000).
16. Ghattas, I.R., Sanes, J.R. y Majors, J.E. *Mol. Cell Biol.* 11, 5848-5859 (1991).
17. Qiao, J. y otros. *Hum Gene Ther* 13, 881-887 (2002).
18. Oumard, A. y otros. 20, 2755-2759 (2000).
19. Lois, C. y otros. *Science* 295, 868-872 (2002).
20. Baron, U. y Bujard, H. *Methods Enzymol.* 327, 401-421 (2000).
21. Bray, M. y otros. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 1256-1260 (1994).

ES 2 298 745 T3

22. **Zufferey**, R. y otros. *J. Virol.* 73, 2886-2892 (1999).
23. **Ailles**, L. y otros. *Mol Ther* 6, 615-626 (2002).
- 5 24. **Cavaliere**, S. y otros. *Blood* 102, 497-505 (2003).
25. **Naldini**, L. y otros. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11382-11388 (1996).
- 10 26. **Baekelandt**, V. y otros. *Hum Gene Ther* 13, 841-853 (2002).
27. **Deglon**, N. y otros. *Hum. Gene Ther.* 11, 179-190 (2000).
28. **Sokolic**, R.A. y otros. *Blood* 87, 42-50 (1996).
- 15 29. **Wong**, E.T., **Ngoi**, S.M. y **Lee**, C.G. *Gene Ther* 9, 337-344 (2002).
30. **Kozak**, M. *Gene* 318, 1-23 (2003).
31. **Mizuguchi**, H. y otros. *Mol Ther* 1, 376-382 (2000).
- 20 32. **Hennecke**, M. y otros. *Nucleic Acids Res* 29, 3327-3334 (2001).
33. **Mazurier**, F. y otros. *Blood* 103, 545-552 (2004).
- 25 34. **Vigna**, E. y **Naldini**, L. *J Gene Med* 2, 308-316 (2000).
35. **Gardiner-Garden**, M. y **Frommer**, M. *J. Mol Biol* 196, 261-282 (1987).
36. **Lavia**, P., **Macleod**, D. y **Bird**, A. *EMBO J* 6, 2773-2779 (1987).
- 30 37. **Johnson**, P. y **Friedmann**, T. *Gene* 88, 207-213 (1990).
38. **Scacheri**, P.C. y otros. *Genesis* 30, 259-263 (2001).
- 35 39. **Vigna**, E. y otros. *Mol Ther* 5, 252-261 (2002).
40. **Baron**, U. y otros. *Nucleic. Acids. Res.* 23, 3605-3606 (1995).
41. **Unsinger**, J. y otros. *Mol Ther* 4, 484-489 (2001).
- 40 42. **Fux**, C. y otros. *J Gene Med* 5, 1067-1079 (2003).
43. **Xie**, M., **He**, Y. y **Gan**, *SNat Biotechnol* 19, 677-679 (2001).
- 45 44. **Trinklein**, N.D. y otros. *Genonze Res* 14, 62-66 (2004).
45. **Takai**, D. y Jones, P.A. *Mol Biol Evol* 21, 463-467 (2004).
46. **Adachi**, N. y **Lieber**, M.R. *Cell* 109, 807-809 (2002).
- 50 47. **Farson**, D. y otros. *Hum Gene Ther* 12, 981-997 (2001).
48. De **Palma**, M. y otros. *Nat Med* 9, 789-795 (2003).
- 55 49. **Follenzi**, A. y otros. *Hum Gene Ther* 13, 243-260 (2002).

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Promotor bidireccional para la expresión de al menos dos secuencias codificantes en dirección opuesta en células animales que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':
- a) una primera secuencia promotora mínima procedente de genomas de citomegalovirus (CMV) o de virus de tumor mamario de ratón (MMTV);
 - b) una secuencia de promotor procedente de un gen animal que comprende una región potenciadora y una segunda secuencia de promotor mínimo;
- 10 conduciendo las dos secuencias promotoras a una transcripción coordinada de las citadas secuencias codificantes en orientación opuesta.
- 15 2. Promotor bidireccional, según la reivindicación 1, en el que la secuencia completa del promotor eficaz procede de genes expresados ubicuamente que comprenden el gen de la fosfoglicerato quinasa o de la ubiquitina.
- 20 3. Casete de expresión bidireccional que comprende esencialmente el promotor bidireccional, según las reivindicaciones anteriores, sitios de inserción adecuados ubicados aguas abajo de cada promotor y sitios de poliadenilación ubicados aguas abajo de cada sitio de inserción.
4. Casete de expresión bidireccional, según la reivindicación 4, que comprende además al menos un elemento regulador post-transcripcional situado aguas arriba de uno o de cada sitio de poliadenilación.
- 25 5. Casete de expresión bidireccional, según la reivindicación 4 ó 5, que comprende además al menos una secuencia de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para expresar tres o más genes.
6. Construcción de expresión que contiene el promotor bidireccional según la reivindicación 1 ó 2.
- 30 7. Construcción de expresión que contiene el casete de expresión bidireccional según las reivindicaciones 4-6.
8. Vector de transferencia génica que contiene la construcción de expresión, según las reivindicaciones 7 u 8, que comprende además secuencias lentivirales o retrovirales.
- 35 9. Utilización del vector de expresión de transferencia génica, según la reivindicación 8, para la preparación de un sistema de administración y de expresión en células animales.
- 40 10. Utilización del vector de expresión de transferencia génica, según la reivindicación 9, en el que las células animales son células de tejidos animales *in vivo*.
11. Utilización del vector de expresión de transferencia génica, según la reivindicación 10, en el que las células de tejidos animales comprenden neuronas cerebrales.
- 45 12. Procedimiento *in vitro* para la expresión coordinada de dos secuencias codificantes exógenas dentro de una célula animal que comprende las siguientes etapas:
- a) clonación de las citadas secuencias codificantes dentro del vector de expresión de transferencia génica, según la reivindicación 8, estando cada secuencia codificante bajo el control de uno de los dos promotores del promotor bidireccional;
 - b) transformación de células animales por medio de los citados vectores;
 - c) permitir la expresión del vector.
- 50
- 55 13. Procedimiento *in vitro* para la expresión coordinada de dos secuencias codificantes exógenas, según la reivindicación 12, en el que la célula animal es una célula humana.
- 60 14. Procedimiento *in vitro* para la expresión coordinada de dos secuencias codificantes exógenas, según la reivindicación 13, en el que la célula humana es una célula humana retransplantable.
15. Procedimiento *in vitro* para la expresión coordinada de dos secuencias codificantes exógenas, según la reivindicación 14, en el que la célula humana retransplantable es una célula hematopoyética.
- 65 16. Procedimiento para la generación de un organismo transgénico no humano que comprende la etapa de la transformación de las células adecuadas con una construcción de expresión que contiene el casete bidireccional según las reivindicaciones 6 ó 7.

ES 2 298 745 T3

17. Procedimiento para la generación de un organismo transgénico no humano que comprende la etapa de la transformación de las células adecuadas por medio de un vector de expresión de transferencia génica según la reivindicación 8.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

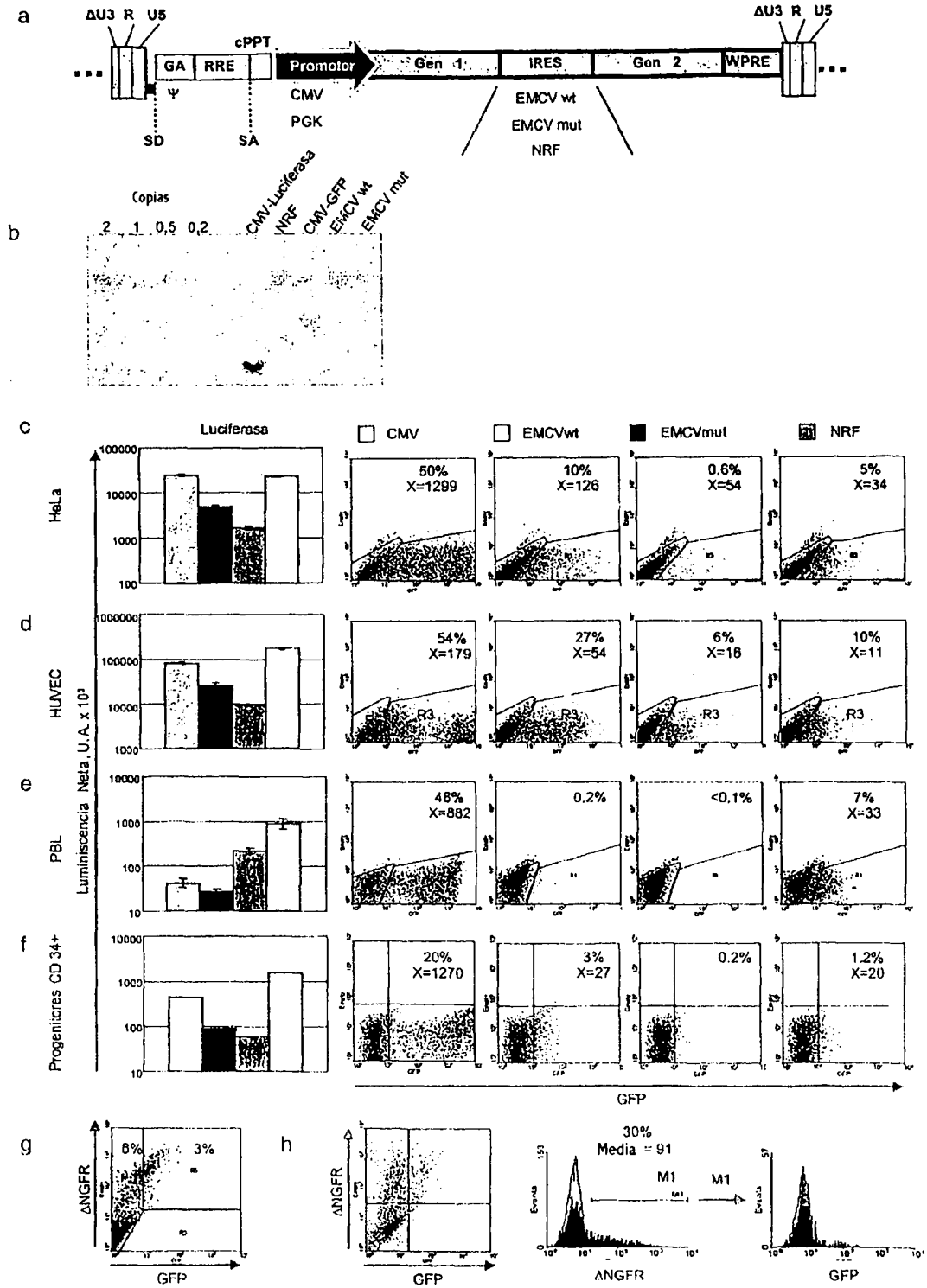


Figura 1

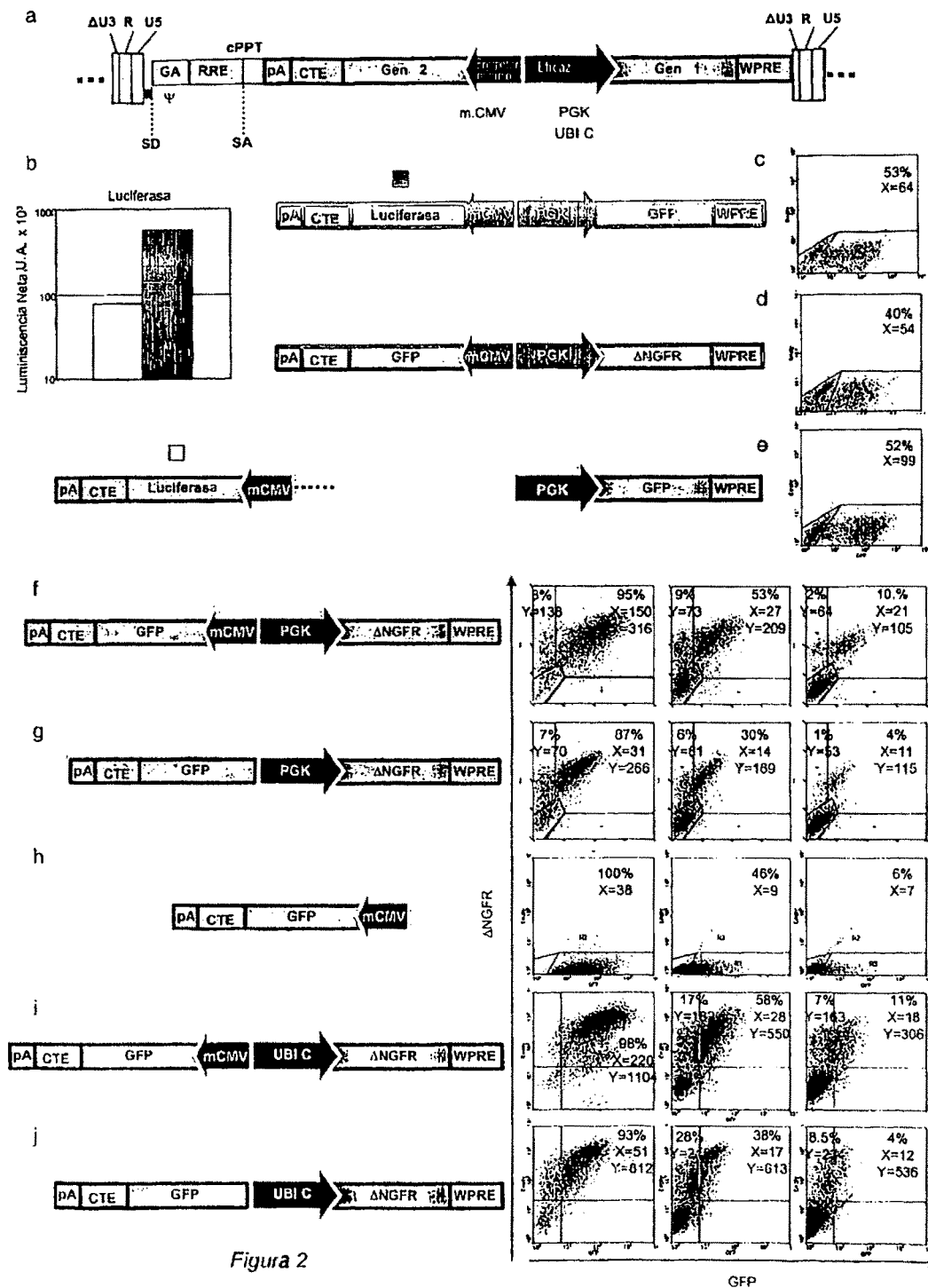


Figura 2

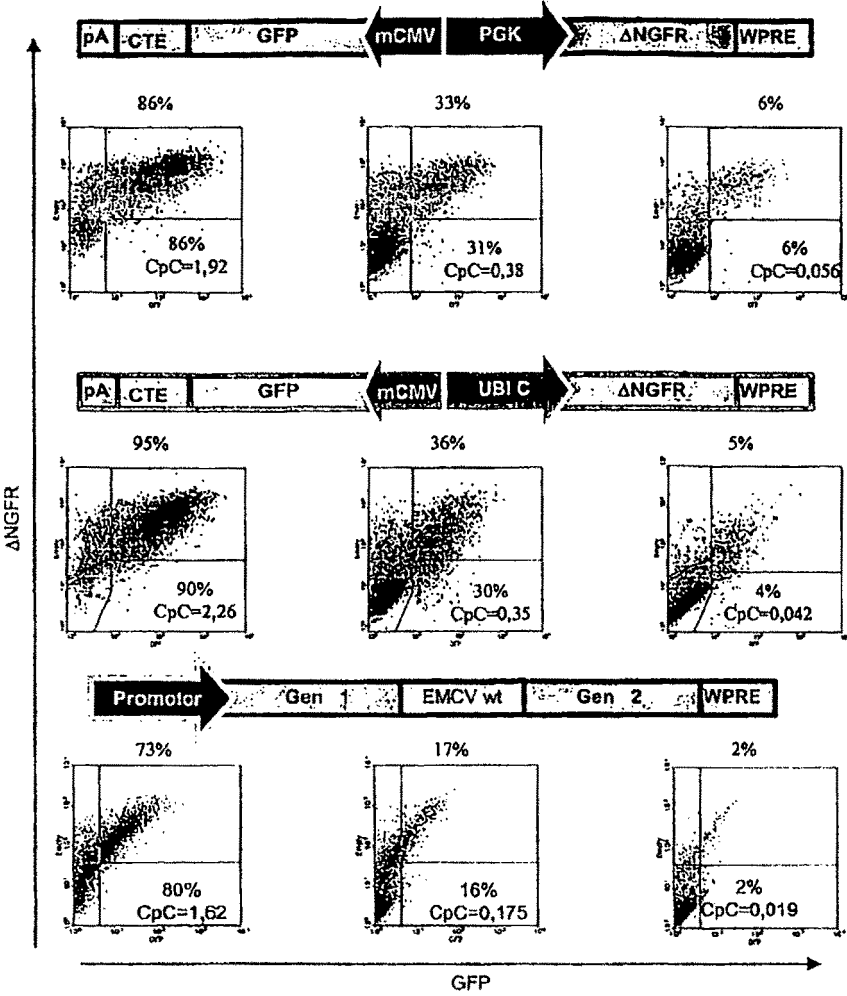


Figura 3

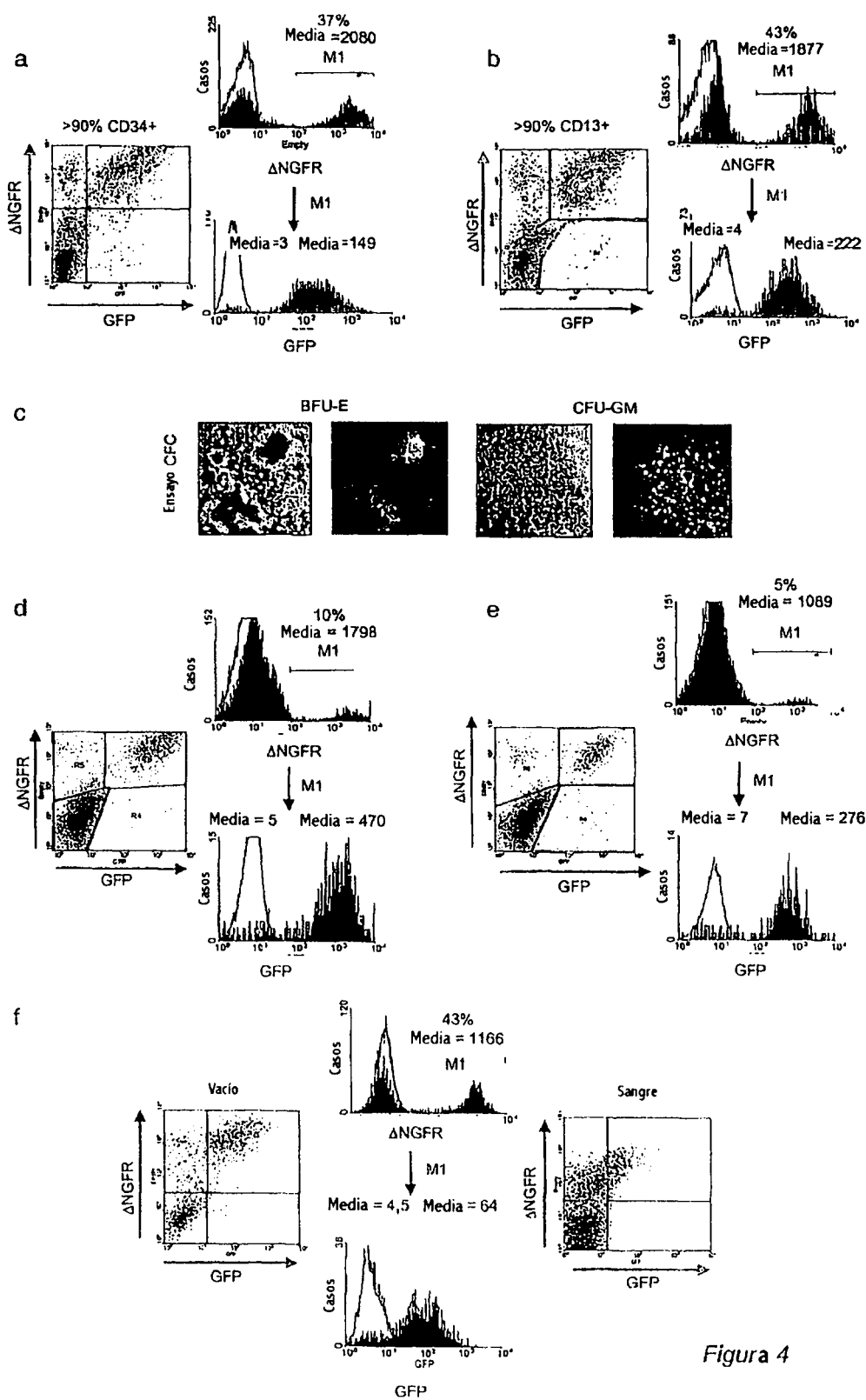


Figura 4

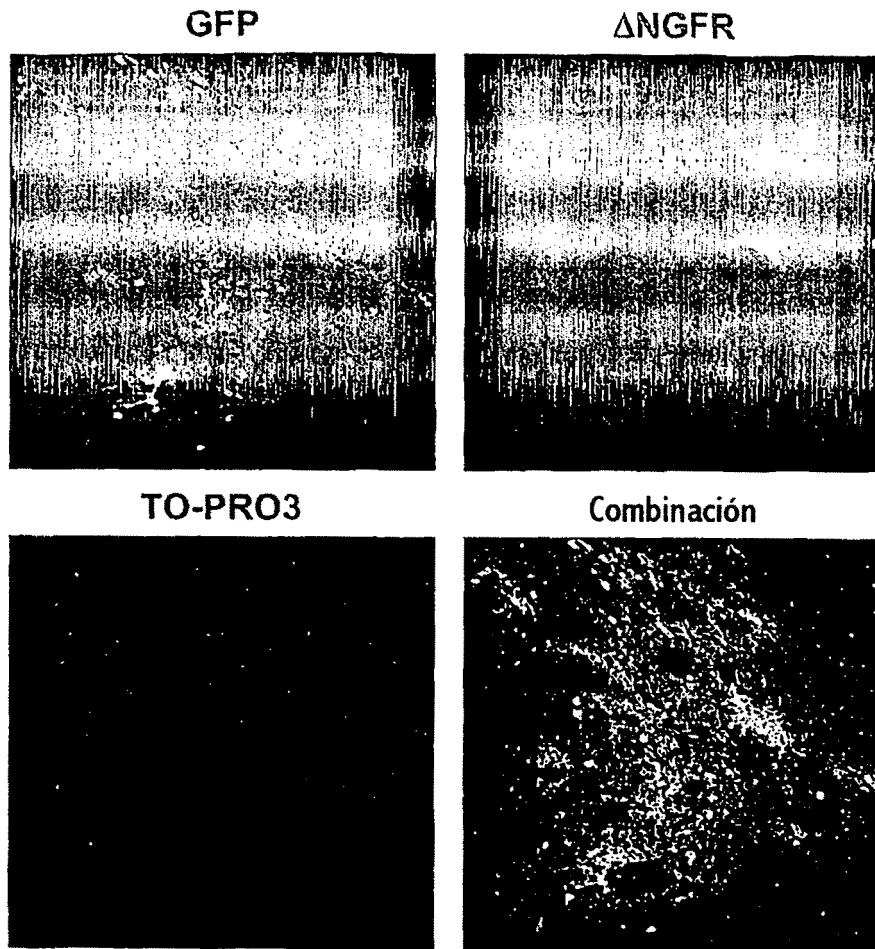


Figura 5

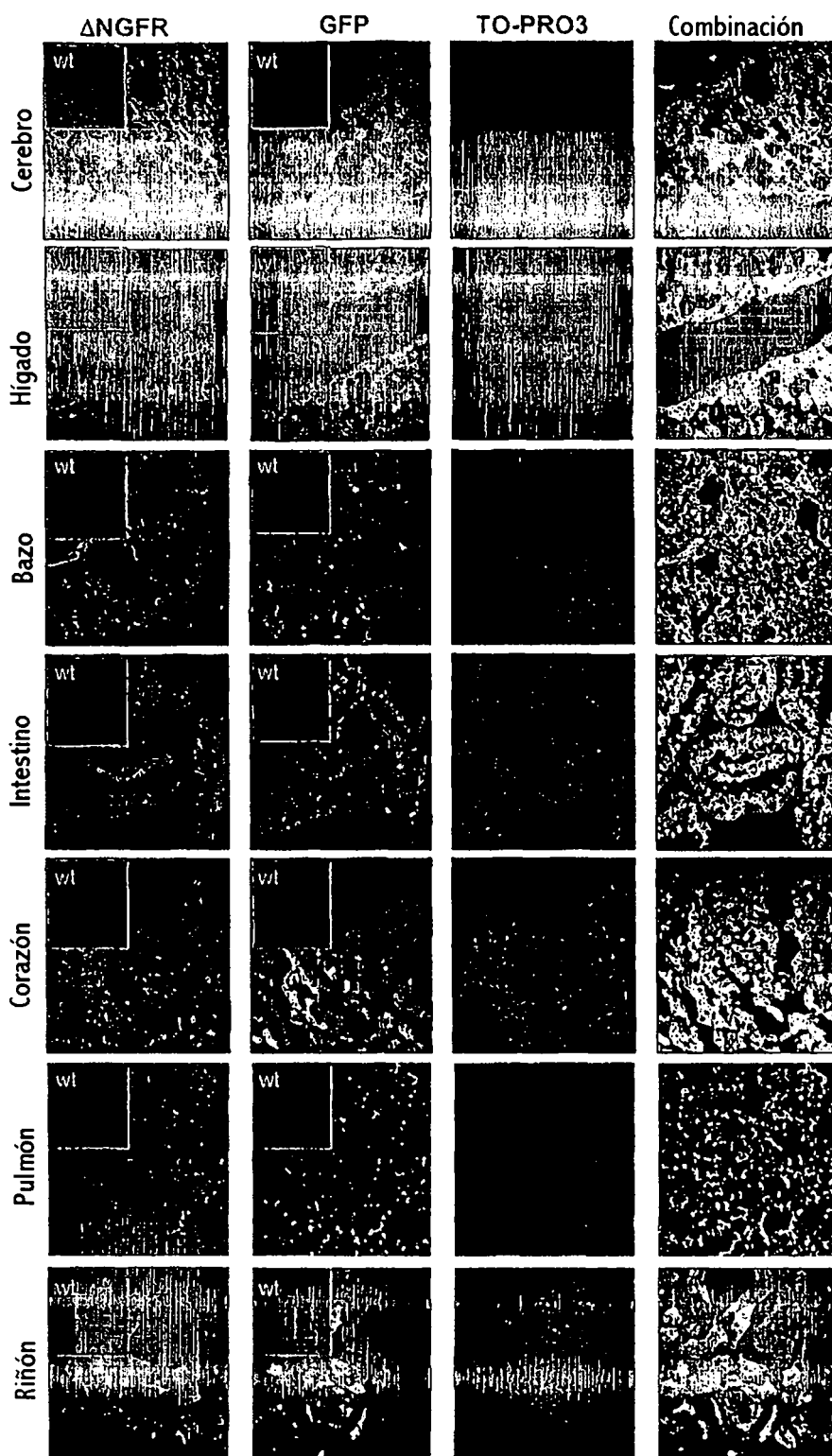


Figura 6

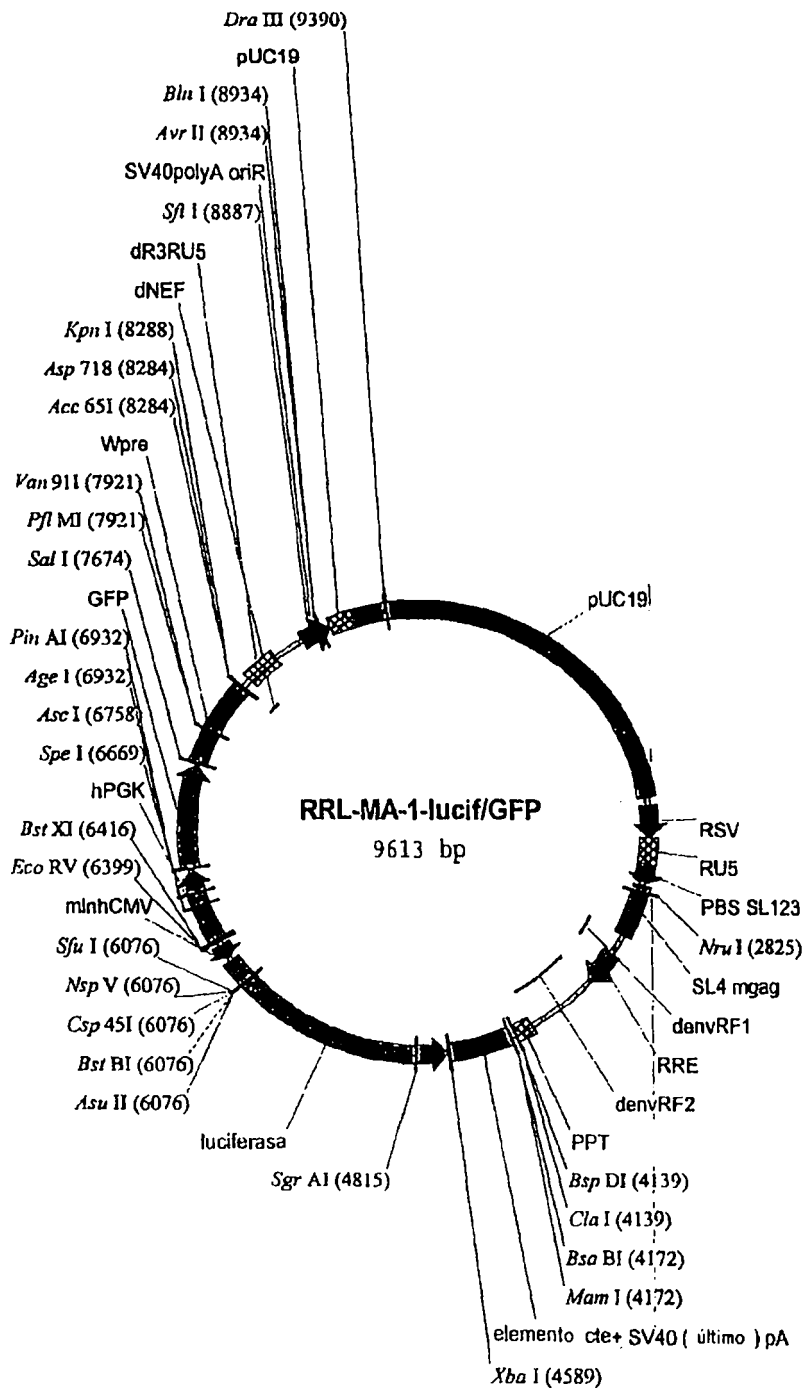


Figura 7a

Figura 7b (1 de 3)

cagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgttatttttctaatacattcaaatatgtatccgctcatgaga
 caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaagggaagatgatgattcaacatttccgtgctgcccttattccctttt
 ggggcaftttgcttctgttttgcaccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagt
 ggggtacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgacactt
 taaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaacicggcggccatatacacttctcaga
 atgacttggtgagatcaccagtcacagaaaagatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccat
 aaccatgagtgataacactcggccaacttcttctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgcttttgcacaac
 atgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccac
 gatgcttgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaacttaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatag
 actggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcctcggcccttccggctggctggttattgctgataaatctgg
 agccgggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtatgtatctacac
 gacggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggttaact
 gtcagaccaagttactatatacttttagattgatttaaaacttatttttaaaaaaggatcaggtgaaagatccttttgata
 atctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaggatctcttgag
 atccttttttctgcgcgtaactctgctgcttcaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggttgtttgccggatcaagagct
 accaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgcttctctagtgtagccgtagttaggcc
 accactcaagaactctgtagcaccgctacatctcgtctgtaactctgtaccagtggtgctgccagtgggcagataag
 tctgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtctgtcac
 acagcccagctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccagctccc
 gaaggggagaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggcggaacagggagcgcacgagggagcttccagggg
 ggaaacgcctgggtatctttagcttctgctgggttccacctctgactgagcgtcgtattttgtgatctcgtcagggggg
 cggagcctatggaaaaacggcagcaacggccttttaccggttctgctccttggccttttgccttttgcctcacatgtcttctc
 cgtatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttagtgagctgataaccctcggcagccgaacgaccgagc
 cagcagtgctgagcaggaagcggaaagcggcaaacgctcgaacgcctcctcccgcggttggccgattcattaa
 tgcagctggcagcagaggttccgactgaaagcgggagtgagcgaacgcaattaatgtgagtgctcactcactatag
 gcaccccaggctttacactttatgcttccgctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagc
 tatgacctgattacgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagctta
 tgaataactctgtagcttcaacatgtaacgaigagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgc
 cgattgggtggaagtaagggtggtacgctgctccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccact
 gaattgccgcatgacagatattgtatttaagtgcctagctcagatacaataaacgggtctctctggttagaccagatcagc
 ctgggagctctctggtaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctttagtgcttcaagtagtgtgtccc
 gctgtgtgtgactctgtaactagatccctcagacccttttagtctggtgaaaatctctagcagtgccgccgcaaca
 gggacctgaaagcgaaggaaaccagagctctcagcagcagcagcctgctgaagcgcgacgcaagaggc
 gaggggcggcactggtgagtagccaaaaattttagctagcggagctagaaggagagatgggtgagagagcgtc
 agtataagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaattcggtaaggcagggggaaagaaaaataaaataaa
 acatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcagtttaalcctggcctgttagaacaacagagcgtgtagaca
 aatactgggacagctacaaccaicctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctatt
 gtgtgcatcaaggatagagataaaagacaccaaggagcttttagacaagatagaggaaagagcaaaaacaaagtaagac
 caccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggaggatagaggacaattggagaagtgaattatataaa
 tataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaaagagaagagtggtgcagagagaaaaagag
 cagtggaataggagctttgtccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgcagcccaatgacgctgacgg
 tacaggccagacaattattgtctggatagtgagcagcagaacaatttgcctgagggctattgagcgcacagcatctgtt
 gcaactcacagtctgggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtgaaagatacctaaggatcaacagctcc
 tggggatttggggtgctctgaaaaactcattgcaccactgctgtccttggatgctagttggagtaataaatctctggaac
 agattggaatcacagacctggatggagtgggacagagaataaacaattsacaagcttaafacactccttaattgaaga
 atcgaanaaccagcaagaaaagaalgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattggttaacataa
 caaattggctgtggtatataaaattatcataatgatagtaggagcttggtaggttaagaatggtttgctgtacttctatagt
 gaatagagttaggcaggatattcaccattatcgttcagaccacctccaaccccgaggggaccgacaggcccggaag

Figura 7b (2 de 3)

gaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacgggtatcggttaact
 ttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgacggggaaagaalagtagacataatagcaacagacatacaacta
 aagaattacaaaacaaattacaaaattcaaaatttatcgatcacgagactagcctcagagatctgatcataatcagccat
 accacattgtagaggtttacttgccttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaacataaaatgaatgcaattgtg
 ttgtaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaggcaatagcatcacaatttcacaaataaggcatttttactgca
 ttctagtttggttgtcctaaactatcaatgtatcttatcatgtctggatctcaaatccctcggagctgcgctgtcttaggtgg
 agtgatacattttatcacttttaccgtctttggattaggcagtagctctgacggccctcctgtcttaggttagtgaanaatgtca
 ctctctaccgtcattggctgtccagcttagctgcaggggaggtggctggatcctctagaattacacggcgatcttccgc
 cctcttggcctttatgaggatctcttgattttcttgcctgagtttccggtaagaccttccggtacttctccacaaacacaa
 ctctccgcgcaacttttccggtgttacttgaactggccacgtaatccacgatctctttccgtatcgtcttccgtctca
 aaacaacaacggcggcgggaagttaccggcgtatcgtcgggaagacctgcgacacctgcctcgaagatgtgggt
 gttggagcaagatggattcaattcagcgggagccacctgatagccttctacttaacagagactcagcggcgaacgat
 gaagaagtgtctctctccagtaagctatgtctcagaatgtagccatccatcctgtcaatcaaggcgttggctctc
 cggattgttacataaccggacataatcataggaacctctcacacagctcgcctcttggattaacgccagcgttccggta
 tccagatccacaaccttccctcaaaaaatggaacaacttaccgaccgcccgggttatcatccccctgggtgtaatcag
 aatagctgatgtatctcagtgagccatccttgcctgataacctggcagatggaacctcttggcaaccgctccccgactt
 ccttagagagggggagcaccagaaatctgtgtaaatgataaatgtattgtcaatcagagtgctttggcgaag
 aaggagaatagggttggcaccagcagcacttgaatcttgaatcctgaaggctcctcagaacagctctctcaaatct
 atacattaaagacgactcgaatccacatacaaatatccgagtgtagtaaacattccaaaaccgtgatggaatggaacaaca
 cttaaactcgcatatccggaatgattgattgcaaaaaataggatctctggcatgcgagaatctcacgagcagctctatg
 aggcagagcgacacctttaggcagaccagtagatccagaggagttcatgatcagtgcaattgtcttgcctatcgaagga
 ctctggcacaaaatcgtattcattaaaaccgggaggtagatgagatgtgacgaactgtacatcgaactgaaatccctggtaa
 tccgtttagaatccatgataataatftttggatgattgggagctttttgacggtcaaaaatftttgcaaccccttttggaaacg
 aacaccaggtaggctgcgaaatgccatactgttgcaaatcaggtcattataaatgtcgtcgcggcgcaactgcaa
 ctccgataaataacgcgcccaacaccggcataaagaatgaagagagtttactgcatacgaactctgtgatttattca
 gccataatcgttcatagcttctgccaaccgaacggacattcgaagtaactcagcgtfaagtgatgccacctgatgtgcat
 ctgtaaaagcaatgttccaggaaccaggcgtatctctcatagccttatgcagtgctctccagcgggtccatcttccagcg
 gatagaatggcggcggccttctttatgttttggcgtcttccatggtgaattccgggaggctggatcggctccgggtgtctc
 tatggaggtcaaaacagcgtggatggcgtcaccaggcgtctgacggttactaaagagctctgcttatataggcctcca
 ccgtacacgccctaccctcgaagaagctgatatcgaattcccacggggttgggttgccttttccaaaggcagccctgggtt
 tgcgagggagcggcgtctctggcgtgttccgggaaacgcagcggcgccgacctgggtctgcacattcttccacg
 tccgttcgacgctcaccggatcttccgctacccttgtgggcccccgccgacgcttctgtccgcccctaaagtcgg
 gaaggttcttgcggttcggcgtgcccggacgtgacaacgggaagccgcagctcactagaccctcgcagacggac
 agcggcaggggagcaatggcagcgcgccgaccgcgatggcgtgtggccaatagcggctgtcagcggggcgccgga
 gagcagcggccgggaaggggcgggtgcgggaggggggtgtggggcggtagtgggcccctgttctgcccgcggg
 tgttccgacttgcgaagcctccggagcgcagctcggcagctcctcgttgaccgaatcaccgacctctctcccag
 ggggatccaccggtcggccatggtgagcaaggcggagagctgttaccggggtgttggccatcttggctgagctg
 gacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgttccggcgagggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacct
 gaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtcccctggcccacctctgaccacctgacctacggcgtgagtgct
 cagccgtlaccggaccacatgaagcagcagacttctcaagtccgcatgccggaaggctacgtccaggagcgcacc
 atcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcggggcgacacctggtgaaccgcatcg
 agctgaagggtatcacttcaaggagcggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacg
 lctatcatgcccgaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcaggagcggcagcgt
 gcagctgccgaccactaccagcagaacccccatcggcgacggcccgtgctgctgcccgacaaccactacctgag
 caccagtcggcctgagcaaaagaccacaagagaagcgcgatcacatggctctggtgaggtctgtgaccggcggg
 gatcactctcggcatggcagctgtacaagtaaagcggcgcgtcacaalcaacctctggattacaaaattgtgaaag
 attgactggtattcttaactatgttgccttttaccgtatgtggatcagctgtttaatgccttgtatcatgctattgcttccglat
 ggccttcaatttctctccttataaactcctggtgctctcttattagggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtgtg

Figura 7b (3 de 3)

gtgcaactgtgttctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggacttgccttccc
 cctccctattgccacggcgaactcatcgccgctgcttcccgtctgctggacaggggctcggctgttgggcaactgaca
 aitccgtggtgttgcggggaagctgacgtccttccatggctgctcgctgtgttccacctggattctgcggggacgtcc
 ttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccggcctgctgcccggctctgcccctctccgcgtctt
 cgccctcgcctcagacgagtcggatctcccttggccgcctcccgcctggaaitcgaagctcggctaccttaagaccaal
 gactacaaggcagctgtagatcttagccacttttfaaaagaaagggggactggaagggttaattcactccaacgaag
 acaagatcgtcttttctgtactgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactaggaacc
 actgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgcccgtctgtgtgactctgtaactagagatcc
 ctgagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatcttattattcaglattataacttgcaaagaat
 gaatacagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatgggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaata
 aagcattttttcactgcaltctagttgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgccctaa
 ctccgccagttccgccattctccgcccatggctgactaatttttttattatgacagggccgagggccctcggcctctg
 agctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcgtcagagctaccaatcgcctatagtgagt
 cgtattacgcgcgctcactggccgtctttacaacgtctgactgggaaaaccctggcgttaccctaactaategcctgca
 gcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccttccaacagttgagcagcctgaa
 tggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcaataagcggcggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctac
 actgccagcgccttagcggccgctccttcgcttctcccttcttctcgcacgttcgccggcttccccgtcaagctcta
 aatcgggggctccccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgaacccaaaaaacttgattaggggtgatggtcacgt
 agtgggcatcgcctgatagacggttttcgcctttgacgttggagtcacgltcttaatagtgactcttgttccaaactg
 gaacaacactcaaccctatctcggcttattctttgattataagggttttccgattcggcctattggttaaaaaatgagctga
 tttaacaaaaatfaacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaatttc

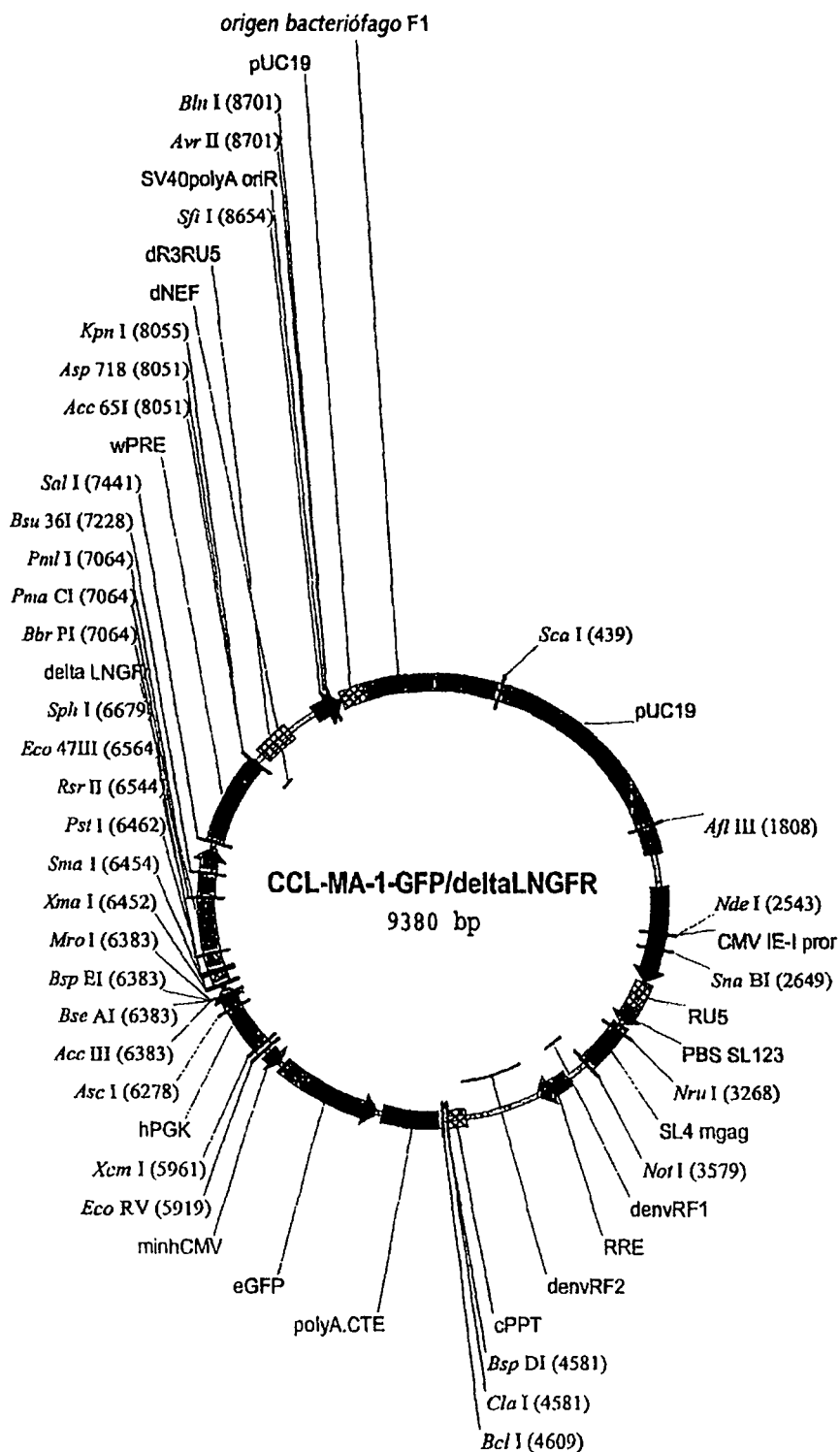


Figura 8a

ES 2 298 745 T3

Figura 8b (1 de 3)

cagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatttttaataacattcaaatatgtatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaagggaagagatgagtattcaacatttccgtgctgcccatttcccttttt
gcgccattttgcccctctgttttgcctcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagt
gggttcatcgaactggatctcaacagcgtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttt
taaagttctgctatggtgcggtattatcccgattgacgcccgggcaagagcaactcggctgccgcatcacactattctcaga
atgacttgggtgagtactaccaggtcacagaaaaacatcttaccggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgccat
aacatgagtataaactgcggccaacttactctgacaacgacggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaac
atgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccac
gatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaacttataactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaataatag
actggatggaggcggataaaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggtttatgctgataaatcgg
agccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctccgctatcgtatctacac
gacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggctcctactgattaagcattgtaact
gtcagaccaagttaactatatacttttagattgatttaaaacttatttttaattlaaaaggatcaggtaagatccctttgata
atctcatgacaaaatcccttaactgagtttctgctcactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaaaggatctcttgag
atccttttttctgcgctaactgctgctgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttggcggatcaagagct
accaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaatactgctctctagtgtaccggttagttagcc
accacttcaagaactctgtagcaccgcctacatactcgtctgctaactctgttaccagtgctgctgccagtgccgataag
tctgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataagggcgcagcggctgggctgaacgggggggtcgtgcac
acagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttccc
gaaggggaaagggcggacaggtatccggtaagcggcagggctggaaacagagagcgcacgaggggagcttccaggg
ggaacgctggtatcttatagtctgctgggttccgccacctgactgagcgtcgttattgtgatgctcgtcagggggg
cggagcctatggaaaaacgccagcaacggccttttaccggttctggccttttctggccttttctcactatgcttctctg
cgttaccctgatcttggataaccgtatfaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgcagccgaacgaccgagcgc
cagcagctgagtgagcaggaagcgggaagagcgcacaatcgcgaacgcaataatgtgagttagctcactcattag
gcaccccaggctttacactttatgcttccggctgatagttgggtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaacagc
tatgaccatgattacccaagcgcgaataaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttggcattgcat
acgttgtatccatataataatgtacattatattggctcatgtccaacattaccgccatgttgacattgattatgactagtatta
atagtaatacaattacggggtcattagttcatagccatataaggagtccgcgttacataacttacggtaaatggcccctgg
ctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgcaataaggactttccattga
cgtcaatgggtggagtattacggtaactgccacttggcagtagatcaatgtatcatatgccaagtagccccctattga
cgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtagaccttattgggacttctacttggcagtagatctacgt
attagctatcgtattaccatgggtgatcgggtttggcagtagatcaatgggctggatagcgggttgactacggggattcc
aagctccacccattgacgtcaatgggagtttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccg
ccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttagtgaaccggggctct
ctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagctgcttga
gtgcttcaagtagtgtgcccgtctgttgtgactctgtaactagatccctcagacccttttagctggtggaaatct
ctagcagtgccgcccgaacgggacctgaaagcgaagggaaccagagctctctcagcagcagactcggcttctga
agcgcgcacggcaagagggcagggggcggcactggtgagtagcgcacaaaattttgactagcggaggctagaaggaga
gagatgggtgcgagagcgtcagttatagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaattcggtaaggccaggggg
aaagaaaaatataaataaacaatataatgtagggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaa
acatcagaaggctgtgacaaaactgggacagclacaaccatccctcagacaggaatcagaagaacttagatcattatata
atacagtagcaaccctctattgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaag
agcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcctgatctcagacctggaggagagatagagggacaat
tggagaagtgaattataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaaagagaagagtg
gtgcagagagaaaaaagcagtggggaatagagccttcttgggttcttgggagcagcaggaagcaatggggcgc
agcctcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgacagcagcaacaattgctgagggctatt

Figura 8b (3 de 3)

ccgcctgccctgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcaactgacaattccgtgggtgttgcggggaagcigacgt
 cctttccatggctgctcgcctgtgttccacctggatctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccag
 cggaccttcctcccggcgctgctccggctctcggcctctccgcgtctcgcctcggccctcagacgagtcggatctc
 cctttgggccgctcccgcttgaattcagctcggctaccttfaagaccaatgactacaaggcagctgtagatcttagcca
 cttttaaaagaaaagggggactggaagggttaattcaactcccaacgaagacaagatctgcttttgcttgaactgggtctt
 ctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctga
 gtgcttcaagtagtgtgtgccgctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaatct
 ctgacgtagtagtcatgtcatcttattcagttataaactgcaagaaatgaatatcagagagtggagggaactgttta
 ttgacgcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaattcacaataaagcatttttctactgactttagttgtggtt
 gtccaaactcaatgatcttattatgtctggctctagctatcccggccctaaactccggccagttccggccattctccgccc
 atggctgactaattttttattatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttt
 tggaggcctaggctttgctgagacgtaccaatcgcctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgtctttaa
 caacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccacaactaactgccttgcagcacatcccctttcggcagctggcgttaata
 gcgaagaggcccgcaccgatcgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcg
 gcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgtacacttgcagcgccttagcggccgcctttc
 gctttctccctcctttctgccacgttcggcggttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttag
 tgccttacggcaccicgaccccaaaaaacttgattaggggtgatgggtcacgtagtgggcatcgcctgatagacggttttc
 gccctttagcgttggagtccacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggctattct
 ttgatitataagggatitgccgattcggcctatigggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaattttaacaaa
 ataitaacgtttacaatttc

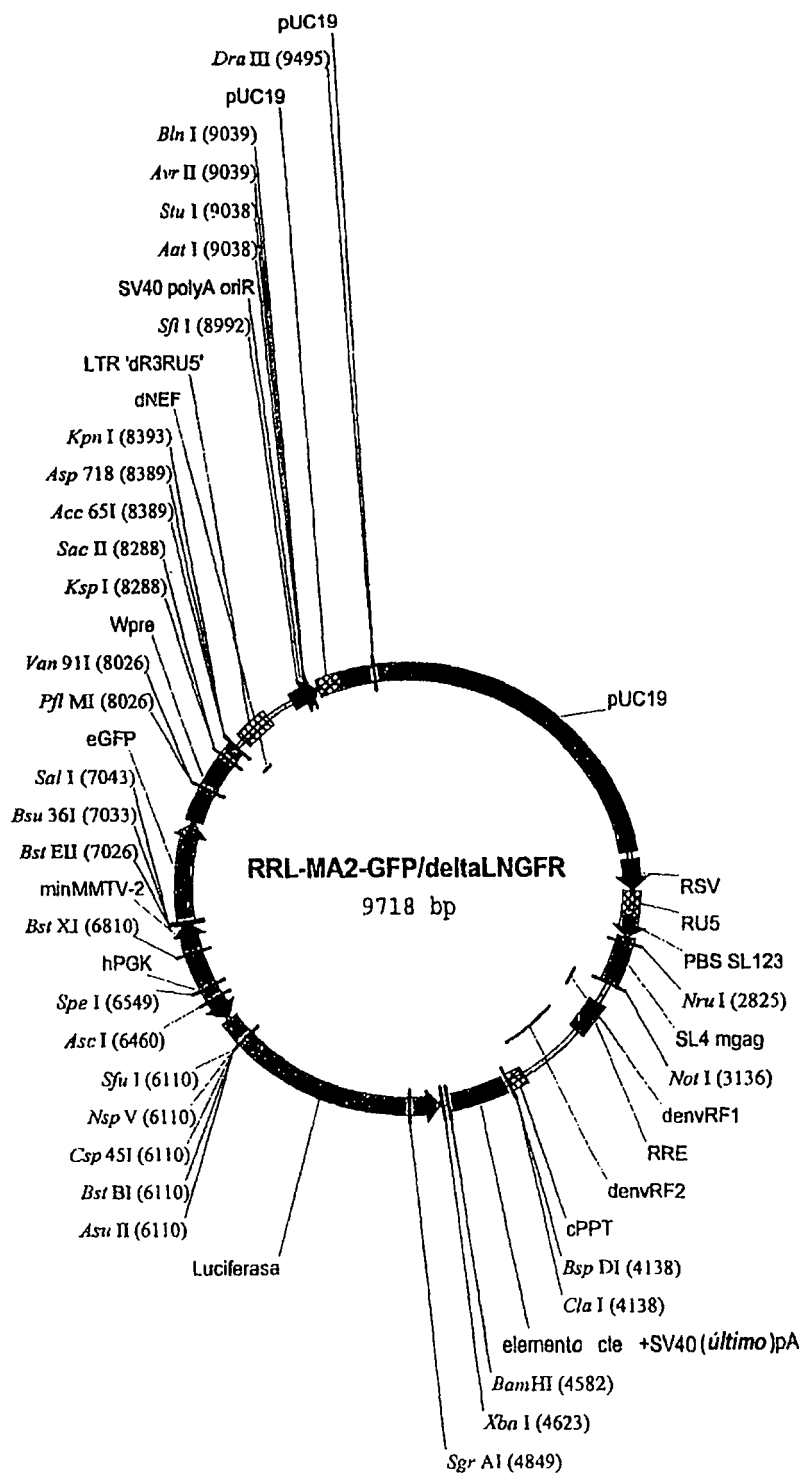


Figura 9a

ES 2 298 745 T3

Figura 9b (1 de 3)

cagggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaatacattcaaatatgatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaggaagatgatgattcaacatttccgtcgccttattccctttt
gcggcattttgccttctgttttgcaccagaaacgctgggtaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagt
gggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcattt
taagttctgctatgtggcgcggattatcccgtattgacgcgggcaagagcaacccggcgcgccatacactattctcaga
atgacttgggtgagctaccagtcacagaaaagcatcttaccggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgccat
aacatgagtgataacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgacaac
atgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccac
gatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaacttactctagcttcccggcaacaattaatag
actggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccttccggcctggctgtttattgctgataaactcgg
agccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctcccgtatcgtattatctcac
gacggggagtcaggcaactatgattgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaact
gtcagaccaagttactatatacttttagattgatttaaaacttcaatttttaataaaagatctaggtgaagatccttttgata
atctcatgaccaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaaagatctcttgag
atcctttttctgcgcgtaactgtctgttcaacaaaaaaaccaccgtaccagcgggtgtttgttccggatcaagagct
accaactcttttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaatactgtccttctagttagccgtagttaggcc
accactcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgttaactcgttaccagtggtgctgcccagtgccgataag
ctgtgttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggcgggctgaacgggggggtcgtgcac
acagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaaagcggcagcctccc
gaagggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgagggagctccagggg
ggaaacgcctggatctttatagctctgtcgggttccaccctctgactgagcgtcgaattttgtatgctcgtcagggggg
cggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggctcctggccttttctggccttttctcacatgttcttctg
cgttaccctgattctgtgataaccgtattaccgctttagctgagctgataccgctcggcgcagccgaacgaccgagcg
cagcagtcagtgagcgggaagcggcaagagcggccaatacgaacaccgctcctcccgcgcgttggccgattcattaa
tgagctggcagcagaggttcccactggaaagcgggcaagtgagcgaacgaatataatgtagtgtagctcactcattag
gcacccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgtgttggaaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagc
tatgaccatgattaccgcaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagctta
tgcaatactctttagcttggcaacatggtaacgatgagttagcaacatgcttacaaggagagaaaaagcaccgtgatgc
cgattgttggaaagtaagggtgtagcgtgcttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccact
gaattgccgactgagagatattgattaaagtgcctagctcagatacaataaacgggctcctctggttagaccagatctgagc
ctgggagctcctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctgagtgcttcaagtagtctgccc
gtctgttgtgtagcttggtaactagagatccctcagacccttttagctagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaaca
gggacctgaaagcgaagggaaaccagagctcctcagcagcaggactcggcttctgaaagcgcgacggcaagaggc
gagggggcggcactggtagtacgcaaaaattttagctagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtc
agtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggtaaggccaggggggaaagaaaaataaataaa
acatatagtatgggcaagcaggggagctagaacgattcgcagttatcclggcctgttagaacaatcagaaggctgtagaca
aatactgggacagctacaacctccctcagacaggtcagaagaacttagatcattataatacagtagcaaccctctatt
gtgtgcatcaaggatagagataaaagacaccaagggaagcittagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagac
caccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggaggagatagggacaattggagaagtgaattataaaa
tataaagtataaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagagaagtggtgagagagaaaaagag
cagtggaataggagcttgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcccaatgacgctgacgg
tacaggccagacaattattgtctggtatagtgacgagcagaacaatttctgagggctattgagggcaacagcatctgtt
gcaactcacagcttggggcaatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcc
tggggatttgggttctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaaatgctagttggagtaataaaactctggaac
agattggaatcacacgacctggatggagtgaggacagagaataaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattgggttaacataac
aaattggctgtggtatataaaaattattcataatgatagtagggccttggtaggttaagaatagtttttctgtacttctatagtg
aatagagttaggcaggatattcaccattatcgttcagaccacctccaaccccagggggaccggacaggccgaagg

Figura 9b (2 de 3)

aatagaàgaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaaaggatcgcacggatcggtaactt
 faaaagaaaaggggggattgggggtacagtcaggggaaagaatagtagacafaafagcaacagacatacaaaactaaa
 gaattacaaaaaacaaltacaaaaattcaaaatttatcgtacacgagactagcctcgagagatctgatcataatcagccatac
 cacattgtagaggttacttgcttataaaacccacacccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgg
 ttaactgtttattgcagcttataatggttacaataaggcaatagcatcacaatttcacaataaggcatttttactgcattc
 tagtttggttgtccaaactcaatgatcttcatgctggatcacaatccctcggaaagctgcgcctgtcttaggtggag
 tgatacattttatcactttaccgtcttggattagcagtagctctgacggccctctgtcttaggtagtgaanaatgcaact
 ctcttaccgtcaltggctgtccagcttagctcgcaggggagggtgtctggatccctggatatcaagaatcgcctcagct
 cagatcctctagaaitfacagggatcttccgcccttctggcctttatgaggatctctctgattttctgctgcgagtttccgg
 taagaccttcggctcgtccacaaacacaactcctccgcgcaacttttccgggtgtactgactggccacgtaatccac
 gatctctttccgtcctcgtctcaaaacaacaacggcggcgggaagtcaccggcgtcctcgcgggaaga
 cctcgcagacctgctcgaagatgtgggggtgtggaagcaagatggattccaattcagcgggagccacctgatagccttgt
 acttaacagagactcagcgggtcaacgatgaagaagtgtcgtctcgtccagtaagctatgtctccagaatgtagccat
 ccatcctgtcaatcaaggcgttggctcgtccggattgttacataaccggacataatcataggacctctcacacagttcg
 cctcttgattaacgccagcgtttccggatccagatccacaacctcgtcctcaaaaaatggaacaacttaccgaccgcg
 cccggttatcatcccctcgggtgtaatcagaatagctgatgtagtctcagtgagccataatccttgcctgatacctggcaga
 tggaaacctctggcaaccgcttcccgaactccttagagaggggagcggccaccagaagcaatctgtgtaaatgataaat
 cgtattgtcaatcagagtgctttggcgaagaaggagaatagggtggcaccagcagcgcactttgaatcttgaatcctga
 aggtcctcagaaacagccttctcaaatctatacattaagacgactcgaatccacatacaaatatccgagtgtagtaaac
 attccaaaaccgtgatggaatggaacaacttaaaatgcagatccggaaatgattgtatgcaaaaataggatctctggc
 atgcgagaatctcagcagggcagttctatgagcagagcgcacaccttaggcagaccagtagatccagaggagttcatgat
 cagtgcaattgtctgtccctcgaaggaactcggcacaanaatcgtattcattaanaaccgggaggtatgatgatgtgacga
 acgtgtacatcactgaaatccctgtaatccgtttagaatccatgataaataattttggatgattgggagctttttgcaact
 caaatttttgaacccttttggaaacgaaccacggtaggctgcgaaatgccatactgttgagcaatcagcttcaatta
 taaatgtcgttcggggcgcaactccgataaataacgcgccaacaccggcacaanaagaattgaagagagttttca
 ctgcatacagcagattctgtgattgtatcagccatctcgttcatagctctgccaaaccgaaggacattcgaagtaactcag
 cgtaaagtgtaccacctgatgtgcatctgtaaaagcaatgttccaggaaccaggcgtatctctcatagccctatgca
 gttgctctccagcgggtccatctccagcggatagaatggcggcggccttctttatgttttggcgtctccatggtgaatcc
 gatcccctggggagagaggtcgggtgattcggtaaacgagggagccgactgcccagctgcgctcgggaggttgcaga
 atgcggaacaccgcggggcaggaacaaggcccacactaccgcccacaccccgctcccgaccgccccttcccgg
 ccgctgctctcggcgcgcccgtgagcagccgctattggccacagccatcgggctggcgcgctgccattgctcctg
 gcgctgctcgtcgcgagggtagtagagcgtgcggcttccgttgcacgtccggcagccgcgaaccgcaaggaac
 ctcccacttagggggcggagcaggaagcgtcggcggggggcccacaagggtagcggcgaagatccgggtgacgctg
 cgaacggagctgaagaatgtgcgagaccagggcggcggcggcgtgcttcccgaaccagcccagagcagccgcg
 tcctcgcgaaccagggctgccttggaaaaggcgcaccccaacccgtgggaattcgaatcaagcttgcctatgtc
 ttttgaatctatcaagcttattgaaatgcttattgaaaccataataanaagagtgctgatttttgagtaaacctgcaacagtc
 ctacattctctctcgtgttggctgtcgtccatccgctcgcgtcgtcacttatccttcaactttcagaggggtccccccgc
 agatcccggtaacctcaggtcgggtcgcacaacctggtgagcaagggcgaggagctgtcaccgggggtgtgcccac
 ctggtcagctggacggcagcgtaacggccacaagctcagcgtgtccggcagggcgaggggcgtgaccctacgg
 caagctgacctgaagctcatctgaccaccggcaagctgcccgtgcccggccacctcgtgaccacctgacctacg
 gctgcaagcttaccgctaccccgaccacatgaagcagcagacttctcaagtcggccatgcccgaaggctacgtc
 caggagcgcacctcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgaggggcagaccctg
 gtgaaccgatcagagctgaaggatcagactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagfacaactaca
 acagccacaacgtctataatgcccagcaagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcagag
 gacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctcccgacaac
 cactacctgagcaccagctccgctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcactggtcctgctggagttcgtg
 ccggccggggatcactcctggcatggagagctgtacaagtaagcggcctcgaacatcaacctctgattacaaaattf
 gtgaaagattgactggtatttcaactatgtgtcctttacgctatgtggatagcgtctttaaactgctttagctatcatgctatgct

Figura 9b (3 de 3)

tcccgatggctttcattttcctccttgataaatcctggttgctgtctcttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtg
gcgtggtgtgactgtgttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgcagctcctttccgggacttc
gctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgctgcccgtgctggacaggggctcggctgttgggc
actgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgctgtgtgcccactggattctgcgagg
gacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagoggacttcttcccggcctgctgcccggctctgcccctctc
cggctctcgccttcgccctcagacgagtcggatcctccttggccgctccccgcctggaattcagactcggtaactttaa
gaccaatgacttacaaggcagctgtagalcttagccacttttaaaagaaaagggggactggaagggctaattcactccca
acgaagacaagatctgcttttgcttactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggtaactagg
gaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtctcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgtgactctgtaactag
agatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatgtcatcttatttactagttataacttgcaa
agaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaattca
caataaagcatttttactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatccc
ccctaactcggccagttccgccattctcggcccatggctgactaattttttattatgcagaggccgagccgcctcgg
cctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcgtcagacgtaccacaattcgcctatag
tgagtcgtattacgcgctcactggcgtctgtttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttaccacaactaactgcc
ttgcagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaaggcccgaccgatcgccttccaacagttgcgcagc
ctgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcaataagcgcggcgggtgtggtgttacgcgcagcgtgacc
gctacacttggcagcgcctagcggccgctccttctgttcttccctccttctcggccacgttcggcggcttccccgtcaag
ctctaaatcgggggctcccttagggttccgatttagtcttacggcacctcgaacccaaaaaacttgattagggtgatggt
cacgtagtgggccatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtccacgttcttaatagtggactctgttcca
aactggaacaacactcaaccctatctcggctattctttgattataaggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatga
gctgatttaacaaaaatfaacgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaatttc

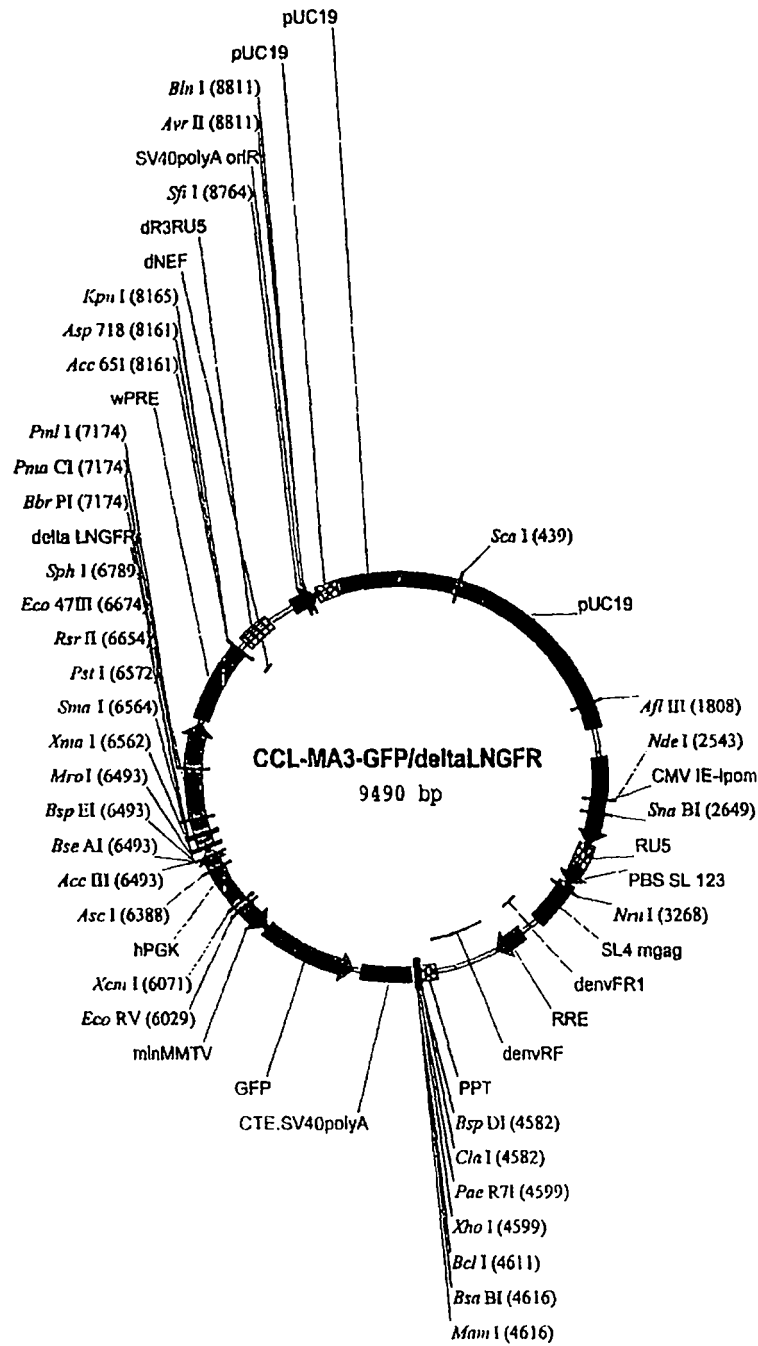


Figura 10a

ES 2 298 745 T3

Figura 10b (1 de 3)

cagggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaaccctatttgtttatttttctaatacattcaaatatgtatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataataltgaaaaggaagatgatgattcaacattccgtgctgcccttattcccttttt
gcggcattttgccttctgttttgcaccagaaacgctggtaagataaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagt
gggttacatcgaactggatcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttt
taaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacccgggcaagagcaacccggctgccgcatacactattctcaga
atgacttgggtgagctaccagtcacagaaaaacatctacggatggcatgacagtaagagaattatgacagtgctgccat
aacatgagtgataaactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaac
atgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgatgaagccataccaacacgacgagcgtgacaccac
gatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactatfaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaataatag
actggatggaggcggataaagtgcaggaccattctgcgctcggccctccggctggctgtttattgctgataaatctgg
agccggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctcccgtatcgtattatctacac
gacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaact
gtcagaccaagtctactatatacttttagattgatttaaaacttatttttaaaaggatctaggtgaagatccttttgata
atctatgacaaaaatccctaacgtgagtttctgactgagcgtcagaccctgataaaagatcaaaagatcttcttgag
atccttttttctgcgcgtaactgtctgcttgaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttccggatcaagagct
accaactcttttccgaaggttaactggctcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagttaggcc
accacttcaagaactctgtgacaccgcctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtgctgctgccagtgccgataag
ctgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggttcgtgcac
acagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactggatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttccc
gaagggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccaggg
ggaaacgcctggatctttatagctctgcgggttccaccctctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggg
cggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttctggccttttgccttttgccttttgccttttgcct
cgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgtgctgataccgctcggcgcagccgaacgaccgagc
cagcagtgctgagcggaggaagcggagagcggcccaatagcaaacggcctcctcccggcgttggccgattcattaa
tgacgtggcagcagaggttcccactggaaagcggcagtgagcgaacgcaataatgtgagtgactcactcattag
gcacccaggtttacttacttctccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaacagc
tatgacatgattaccgcaagcgcgcaataaccctactaaaggaacaaaagctggagctgcaagcttggcattgcat
acgttctatcattatcaataatgtacatttatttggctcatgtccaacattaccgcatgttgacattgatttactagttat
atagtaataaactacggggtcattagttcatagccatataatggagttccggttacataacttacggtaaatggcccgttgg
ctgaccgcccaacgaccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttcattga
cgtcaatgggtggagttactggtaactgcccacttggcagtcacatcaagtgtatcatatgccaagtagcccccattga
cgtcaatgacggtaaatggcccgttggcattatgcccagtcacatgaccttattggactttcctacttggcagtcactacgt
attagtcacgctattaccatggtgatcgggtttggcagtcacatcaatgggcgtggatagcgggttactcaggggattcc
aagctccacccattgacgtcaatgggagtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccg
ccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttagtgtaaccgggctct
ctggttagaccagatctgagcctgggagctctctgctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctga
gtgctcaagtagtgtgcccgtctgtgtgactctgtaactagatccctcagaccctttatgtagtggtaaatct
ctagcagtgggccccaacaggacgtgaaagcgaagggaaaccagagctctctcagcagcagcagcagcagcagcagc
agcgcgcacggcaagagggcggggcggcagctggtagtagcggcaaaaattttagtagcggaggctagaaggaga
gagatgggtgagagcgtcagtaattaagcgggggagaattagatcggatgggaaaaattcggtaaggccagggggg
aaagaaaaataataaataaataatagtagggcaagcagggagctagaacgattcgcagtttaactcctggcctgtagaa
acatcagaaggctgtgacaaaactgggacagctacaaccatcccctcagacaggatcagaagaacttagatcattata
atacagtagcaaccctctattgtgtcatcaagtagagataaaugacaccaaggaagctttagacaagatagaggag
agcaaaaacaaagttaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggagggagatagaggacaat
tggagaagtgaattataataataaagttagtaaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggaagagagagagtg
gtgcagagagaaaaagagcagtggaataggagctttgtcttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgc
agcctcaatgacgctgacggtagcggccagacaattattgtctggtagtgacagcagaacaattgtgagggctatt
gaggcgaacagcatctgtgcaacacagcttggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtgaaagata

Figura 10 b (2 de 3)

cctaaaggatcaacagctcctggggattggggtgctctggaaaactcattgcaccactgctgtgacctggaatgctagt
gagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaattaacaattacacaagctta
atacactcctaattgaagaatgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttt
gtggaattggittaacatacaaaattggctgtggtatataaaaattatcataatgatagtaggaggcttgtaggttaagaatag
ttttgctgacttictatagtgaatagagttaggcagggatattaccattatcgtttcagaccacctccaaccccaggggg
accggacaggcccgaaggatagaagaagaggtggagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatc
tcgacggatcggtaacttttaaaagaaaaggggggtgggggtacagtgcaggggaaaataagtagacataatg
caacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatttatcgtatcacgactagcctcgaagg
gatcgtatcataatcagccataccacattigtataggtttactgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaac
ataaaatgaatgcaattgtgtgtaactgtttatgcaactataatggtitacaaataagccaatagcatcaaaattcacia
ataaggcattttttcactgcatctagtttggttgtccaaactatcaatgtatcttatcatgctggatcicaaatccccctggaa
gctgacctgctttaggtggagtatacattttatcactttaccgctttggattaggcagtagctcagcggccctcgt
cttaggttagtgaanaatgtcactccttaccgctcattggctgtccagcttagctcagggggaggtggctggatccaccat
gtctagagaataggaactcgaataggaactcgcggccttactgtacagctcgtccatgcccagagtagctccggc
ggcgggtcacgaactccagcaggaccatgtgacgcgctcgtggggctttgctcaggggcggactgggtgctcaggt
gtgggtgctggggcagcagcagggggcgtcggcgtgggggtgttctgctgtagtggtcggcagctgcacgtcggc
tcctcgtggtggcggatctgaagttcaccttgatccttctgctgctggccatgataagacgttgggtgtgtg
gttactcagcttgcaccaggatgtgcccctcctgaagtcgatgccctcagctcgtgaggtcaccagggtgct
gcccctgaactcacctcggcgcgggtctgtagttgccctcgtccttgaagaagatggtgctcctggactgacctc
ggcatggcggactgaagaagtcgtgctgctcattgtggtcgggtgagcggctgaagcactgcacgctgtaggtcaggg
ggctacaggggtggcagggcagcttggcgggtggtgcagatgaactcagggcagcttccgtagggtggc
atcggcctcggcctcggcagacgctgactgtggcctgttactgctgctcagctcagctcagcaggatgggaccaccc
cggtgaacagctcctcggccttgcctcaccatggtgtcagccgacctgagggtgaccgggatctcggggggaccctc
gaaaagtgaaggataagtgacgagcgggagggatggcgaacagacacaaacacacgagagaagaatgttaggact
gttgaagttaactcaaaaatcagcactcctttatattatggtttacataagcattacataaagactggatagattcaaaa
cataggcaagcctgatacgaattccacggggtggggtgctcctttcaaggcagccctgggttgcgcagggacgc
ggctgctcggcgtggttccgggaaacgagcggcggcaccctgggtcctgcacattctcagctcgtcgcagcgt
caccggatctcggcgtaccctgtgggccccggcagcgtcctgctcggcccctaagtcgggaaggtccttgcg
gttcggcgtgcccggactgacaaacggaagccgcagctcactagtaccctcgcagacggacagcggcagggagc
aatggcagcgcgccaccgcgatggcgtgtgccaatagcggctgctcagcggggcgcgccgagagcagcggcgg
gaagggcgggtgctgggaggggggtgtggggcggtagtggggcctgtcctgcccgcgggtgtccgacttgc
agcctcgggagc
ctgaggaattcggcgcggcagctcggcgggagggggggcgtggagcgcagcgcagcgcagcgcagcgcagc
tccgcaaacggaccgagctggaagtcgagcgtcggcgggagggcggcggatggggcaggtgccaccggcgc
gcccagggcggcggcctgctgctgttctgcttctgggggtgtccttggaggtgccaaggaggatgcccacagg
cctgtacacacacagcggtagtgcgcaaacctggaacgtggcggaggtgtggccagccttggagccaaccag
accgtgtgagcctcctggacagcgtgacgttctccgactggtgagcgcgaccgagcctgcaagcgtgcaccg
agtgcgtgggctccagagcatgtcggcgcgtgctggaggccgacgacgcctgtgcccgtgcgctacggctact
accaggatgagacactggcgtcgcagggctgcccgtgtgagggcgggctcgggctcgtgttctcctgccagg
acaagcagaacaccgtgtcagaggagtccccgacggcagctatccgacgagccaaccacgtggaccctgctcgc
cctgaccctgtgcgaggacaccgagcggcagctcggcagtgacacgctggggcagcggcaggtgcgaggagatc
cctggcgttgattacaggtccacacccccagagggctggacagcagccccagcaccagggagcctgaggca
cctccagaacaacctcatagcagcaggtggcaggtgtggtagccacagtgatggcagctcccagcccgtgtg
cccgaggcaccaccgacaacctatcctgtctattgtccatcctggctgctgtggtgtgggcttggcctacatagcc
ttcaagaggtggaacagggggatcctctagagtcgagctagagtcgacaatcaacctctggattacaaaattgtgaa
ttgactggatcttaactatgtgctcctttacgctatgtggtacgctgctttaaactccttggatcatgcttccg
gcttcaatttctcctcctgtataaatcctggtgctgtctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggaacgtgctg
tgcactgtgtgctgacgaacccccactggtggggcattgccaccacctgtcagctccttccggacttcccttcccc

Figura 10b (3 de 3)

ctccctattgccacggcggaaacatcgcggcctgcctgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggactgacaat
tccgtggtgtgtcggggaagctgacgctccttccatggctgctcgcctgtgtgccacctggattctgcgcgggacgctctt
ctgctacgtcccctcggccctcaatcagcggaccttccctcccgcggcctgctgccggctctcggcctctccgcgctctc
gccttcgcctcagacgagtcggatctcccttggggcgcctcccgcctggaattcagctcggtagcttaagaccaatg
actacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaaagggtaattcaccccaacgaaga
caagatctgcttttgcttactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacca
ctgcttaagcctcaataaagcttgcttgcctgagtgctcaagtagtgtgtcccgtctgttgtgactctgtaactagatccc
tcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatgtcatcttattcagattataactgcaaagaaatg
aataatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggtacaaaataaagcaatgcatcacaattcacaataa
agcatttttctactgcattctagttgtggttgcctcaaacatcaatgtatcttcatgtctggctctagctatcccgcocctaac
tccgccagctccgccattcctccgcccatggctgactaattttttattatgcagaggccgaggccgcctcggcctctga
gctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcctcagagacgtaccaattcgcctatagtgagtc
gtattacgcgcgctcactggcctcgtttacaacgctgtgactgggaaaacctggcgttaccacactaatgcctgcag
cacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccttcccacagttgcgcagcctgaat
ggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcggcgcattaagcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctaca
cttggcagcgcctagcggccgctccttctccttctccttctcgcacgctcgcggcttcccgtcaagctctaa
atcgggggctccctttagggtccgatttagtctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattagggtgatggtcacgta
gtgggccatcgcctgatagacggttttgcctttgacgttggagtcacgttcttataataggactctgttccaaactgg
aacaacactcaacctatctcggctattctttgattataagggatttgcgattcggcctattggttaaaaatgagctgatt
taacaaaattaacgcgaatttaacaaaataaacggttacaatttc

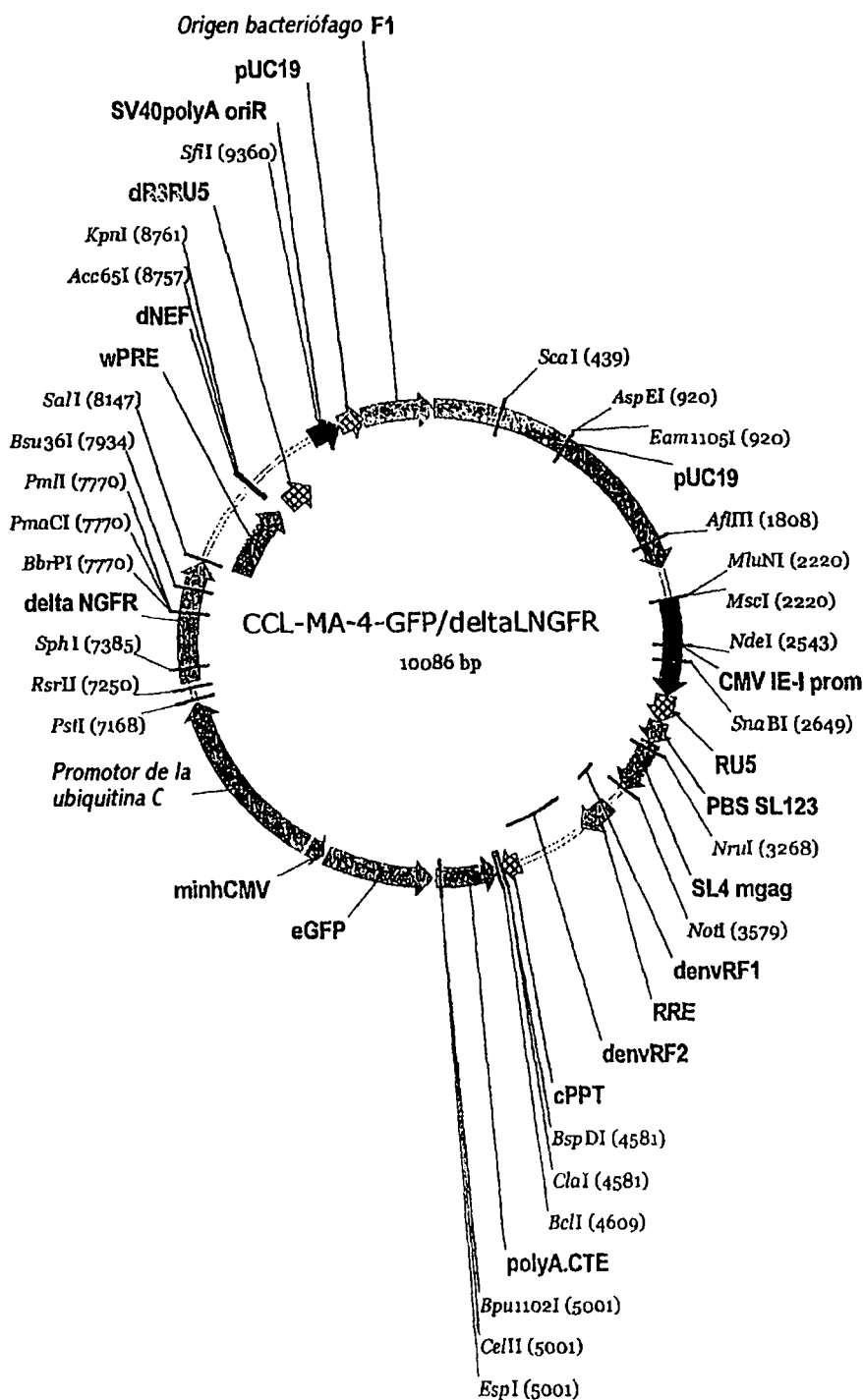


Figura 11a

ES 2 298 745 T3

Figura 11b (1 de 3)

cagggtggcactttcggggaaatgtgcgcgggaacccctattgtttatTTTTCTAATACATTCAATATGTATCCGCTCATGAGA
CAATAACCCGTATAATGCTCAATAATTAATAAAGGAAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGCGCCCTTATCCCTTTTT
GGCGCATTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT
GGGTTACATCGAAGTGGATCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGATTTTCCCGGAAAGACGTTTCCATGATGAGCATT
TAAAGTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCGATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTAGA
ATGACTGGTGGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCAT
AACCATGAGTGATAACTGCGGCCAACCTACTTGTACACGATCGGAGGACCAGGAGGCTAACCGCTTTTTGCACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTGCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATAACTGGCGAACTACTACTCTAGCTTCCCGCAACAATAATAG
ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGGAGCGTGGGCTCGCGGATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTACTACAC
GACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTGTAAC
GTCAGACCAAGTTACTCATATAIACCTTAGATTGATTAACATTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATA
ATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAG
ATCCTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGTTGCAACAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGTTTGTGCCGGATCAAGAGCT
ACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCC
ACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCACCTACATACCTCGCTGCTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
TCGTGCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGGTCTGTGCAC
ACAGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCAGACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC
GAAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGG
GGAACGCCTGGTATCTTATAGTCTGTGGGTTCCGACCTCTGACTGAGCGTCTGATTTTGTGATGCTGTCAGGGGGG
CGGAGCCTATGGAACCGCAGCAACGCGGCTTTTACGGTCTGCTGGCTTTTGTGGCTTTTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCCTTTGAGTGGTCTGATACCCTCGCCGAGCCGAGCCGACGAGCG
CAGGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAACCCCTCTCCCGCGGTGGCCGATTCATTAA
TGCACTGGCACGACAGGTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGGCGCAACGCAATAATGTGAGTGGTCTACTACTATTAG
GCACCCAGGCTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAAITGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAACAGC
TATGACCATGATTACCCAAGCGCAATAACCCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAAGCTGGCCATTGCAT
ACGTTGATCCATACATAATATGTACATTATATTGGTCATGTCACACTACCACCATGTTGACATTGATTATTGACTGTTATTA
ATAGTAATCAATTACGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGG
CTGACCGCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGAGGTATGTTCCATAGTAACCCAATAGGACTTCCATTGA
CGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGA
CGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCACTGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTACGGGGATTCC
AAGTCTCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGCTGTAACAACCTCG
CCCATGACGCAATGGCGGTAGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGGGTCTCT
CTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGCTGCTAAGGAAACCCACTGCTTAAAGCTCAATAAAGCTGCTTGA
GTGCTCAAGTAGTGTGCTGCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCTTTTATGCTAGTGGAAAATCT
CTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTGAAAGCGAAAGGGAACCAAGAGCTCTCTGACGCAAGGACTCGGCTTGTGA
AGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGGTACGCCAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAATCGGTTAAGGCCAGGGGG
AAAGAAAAATATAAATAAACATATAGTATGGCAAGCAGGAGCTAGAACGATTCGAGTTAATCCTGGCCTGTAGAA
ACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACAGGATCAGAAGAAGTATGATCATTATA
ATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTCATCAAGGATAGAGATAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGAAG
AGCAAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGCGCTGATCTCAGACCTGGAGGAGGAGATAGAGGGACAAT
TGGAGAAGTGAATATATAAATAAAGTAGTAAAATTAACCATTAGGAGTAGCACCACCAAGGCAAGAGAAGAGTGT
GTGAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTGTCTTGGTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAACTATGGGCGC
AGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATATTGCTGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATT
GAGGCGCAACAGCATCTGTGCAACTCACAGTCTGGGCAATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA

Figura 11 b (2 de 3)

cctaaaggatcaacagctcctggggattgggggtgctctggaaaactcattgcaccactgctgctcctggaatgctagttg
 gtagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagctta
 atacactccttaattgaagaatcgc aaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttt
 gtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggagcttggtaggttaagaatag
 ttttctgtactttctafagtgaatagagttaggcaggatattaccattatcgttcagaccacccccaaccccgaggggg
 acccgacaggcccgaaggaaatagaagaagaaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtaacggatc
 tcgacggatcggftaacctttaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgacagggaaagaatagtagacataatag
 caacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatttatc gatcacgagactagcctcgaag
 atcigtatcataatcagccataccacattgtagaggtttactgcttaaaaaacctcccacaccccccctgaacctgaaaca
 taaaatgaatgcaattgttgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataaggcaatagcatcaaaattcacaaa
 taaggcattttttactcactcattctagtttggcttgc caaacatcaatgtatctatcatgctggatc caaatccctcggaa
 ctgcgctgtcttaggtggagtgatacattttatcactttaccctgtttggattaggcagtagctcgaaggccctcgtct
 taggttagtgaaaaatgtcactccttaccctgctcattggctgctcagcttagctcgcaggggagggtgcttgatccgagctc
 gaattggccgcttactgtacagctcgtccatgccgagagtatcccggcggcgggtcacgaaaccagcaggaccatgtg
 atcgcgcttctcgttggggtccttctcagggcggactgggtgctcaggtagtggtgctgggcagcagcacggggccgtc
 gccgatgggggtgttctgctgtagtggtcggcggagctgcacgctgccctcctcgtatgttggcggatctgaagtacc
 ttgatgccgttctctgctgtcggccatgatatagacgttggctgtttagttgtactccagctgtgccccaggatgtgcc
 gtcctcctgaaagtcgatccctcagctcgtatgcgggtcaccagggtgctgccctgaactcactcggcgcgggtctgt
 agttgccgtcgtcctgaaagaatggtgctcctggacgtacccctcgggcagggcggacttgaagaagtcgtgctgctt
 catgtgctggggtagcggctgaagcactgcacgccgtaggtcagggtgggtcacagggtggccagggcacgggca
 gcttggcgggtggtgcagatgaactcagggtcagcttggcgtaggtggcctcggccctcggccctcggccagcagcgtgaact
 tggggcgttactcgtcgtccagctcagccaggatgggaccaccccggtgaacagctcctcggccctgctcaccatgg
 tgaattccgggaggctggatcgggtccgggtgcttctatggaggtaaaacagcgtggatggcgtctccaggcgtatctga
 cggttactaaacgagctcgttataataggcccccaccgtacacgctaccctcggagaagctgattaaccctgctggct
 ccgatctggccctcggcgggggttggcggcctcccggcggcggccccctcctcacggcgagcgtgccacgtcagac
 gaaggggcgcagcagcgtcctgatctccggccggacgctcaggacagcggcccgtgctcataagactcggccttag
 aacccagatcagcagaaggacatttaggacgggactgggtgactctaggcactggtttcttccagagagcggaac
 aggcgaggaagtagtccctctcggcattctcgggagggatcctcggggcgggtgaacgccgatgattatataagg
 acgcccgggtgtggcacagctagttcgtcgcagccgggatttgggtcggcgggtctgttggatcgtgtgatcgtc
 ctgtgtgagttcgggctgctgggctggccggggcttctggccggcggggcggcgggtgggagcgaagcgtgtggag
 agaccgccaagggtgtagtctgggtcggcagcaaggttgcctgaactgggggttgggggagcgcacaaaatggc
 ggctgtcccagcttgaatggaagacgttgaaggcgggctgtgaggctgttgaacaagggtgggggcatgtgtggg
 cggcaagaaccgaaggtctgaggcctcgtatgcgggaaagctcttattcgggtgagatgggctggggcaccatctg
 gggaccctgacgtgaagtgtcactgactggagaactcgggttctgctgctggttgcggggggcggcagttatgctggtcc
 gttgggagtgacaccgtaccttgggagcggcggcctcgtcgtgctgacgtcaccgttctgttggcttataatgcagg
 gtggggccacctgccggtagggtgtgggtaggctttctcgtcgcaggacgcagggtcgggctagggttaggctctcct
 gaatcagacaggcggcggacctctggtgaggggaggataagtgaggcgtcagttcttggctggtttatgtacctatctc
 ttaagtactgaagctcgggttgaactatgcgctcgggggtggcaggtgtgttggtaagtttttaggcacctttgaaatgt
 aatcatttgggtcaatatgtaatttcagtgttagactagtaaatgtccgctaaattctggccgtttttggctttttgttagacgaa
 gcttggctgcaggaattcgggcccggccagctccggcgggagggggggcgtggagcgcagcgcagcgcagcc
 ccatcagctccaaaagcggaccgagctggaagtcgagcgtcggcggggaggcgggcatgggggaggtgaccacc
 ggccgcgccatggagcgggcccggcctgctgctgtgctgcttgggggtgtccctggaggtgccaaggaggatgcc
 ccacaggcctgtacacacacagcgggtgagtgctgcaaaagcctgcaacctgggaggggtggccagccttgggagc
 caaccagaccgtgtgtagccctgcttggacagcgtgacgttctccgacgtggtgagcggaccgagccgtgcaagccg
 tgcaccgagtgctggggcctccagagcatgtcggcggctgctgtggaggccgacgacgccgtgtgccgtcgcctac
 ggctactaccaggatgagacgactgggcgctgcgagggctgcccggctgtgcgaggcgggctcgggctcgtgttctcct
 gccaggacaagcagaacaccgtgtgcgaggagtgccccgacggcagctattccgagggccaaccagtgaggaccg
 tgcctgccctgcaccgtgtgcgaggacaccgagcggcagctccggagtgacacagctggggccgacggcggagtgcca

Figura 11b (3 de 3)

ggagatccctggccgttgattacacggctcacacccccagaggctcggacagcacagccccagcaccaggagcc
fgaggcactccagaacaagacctcatagccagcacggagggtggtgaccacagtgatgggcagctcccagccc
gtggtgaccgagccaccaccgacaacctatccctgctattgctccatcctggctgctgtggttggcccttggccta
catagcctcaagagggtggaacaggggaccccttagagtcgagcttagagtcgacaatcaacctctggaltacaaaattg
tgaaagattgactggtatcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgcctttaatgcctttgatcatgctattgctc
ccgatggcttcaittctcctccttgataaatcctgggtgctgctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtgg
cgtggtgtgcaactgtgttgctgacgcaacccccactgggtggggcaltgccaccacctgtcagctccttccgggacttccg
ctttccccctccattgccacggcggaaactatcgcgcctgcttgcctgcccgtctggacaggggctcggctgttgggca
ctgacaattccgtggtgtgctggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgcacctggattctgcgccc
acgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcctgctcggcctctgcggccttcc
gctcttcgcttcgcccagagcagtcggatcctccttggggccgctccccgcctggaattcagctcggtaacttaag
accaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggtaactcactccaa
cgaagacaagatctgcttttgcctgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggtaactagg
aaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtcccgtctgttgtgtgactctgtaactaga
gatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatcttagcagtagtagttcatgtcattattattcagttataacttgcaa
gaaatgaatatcagagagtgagaggaaactgtttaitgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcac
aaataaagcatttttctactgcaictagttgtggttgtccaaactcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgc
cctaactccgccaggtccgccattctccgccccatggctgactaatttttttattatgcagaggccgaggccgcctcggc
ctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcgtcgagacgtaccaattcgcctatagt
gagctgtattacgcgcctcactggccgtcttttacaacgtctgactgggaaaacctggcgttacccttaactaatcgcct
tgcagcacatcccccttccagctggcgtlaalagcgaaggcccgcaccgatcgccttccaacagttgcgcagcc
tgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtacggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccg
ctacacttgcagcgccttagcgcctccttcccttctccttctccttctcgcacgtcggcggcttccccgtcaagc
tctaaatcggggctcctttagggttccgattlagtcttacggcacctcagcccacaaaacttgattagggtgatggtc
acgtagtgggccatcgcctgatagacggttttcgccccttgacgttggagtcacgtctttaatagtgactcttgttcaa
actggaacaacactcaacctatctcggctatcttttgattataagggttttgcgatttcggcctattggftaaaaaatgag
ctgatttaacaaaatttaacgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaattcc

ES 2 298 745 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR
- 5 <120> VECTORES LENTIVIRALES QUE LLEVAN PROMOTORES BIDIRECCIONALES DE SÍNTESIS Y UTILIZACIONES DE LOS MISMOS
- <130> 81240PCT
- <140> PCT/IT2004/000227
- 10 <141> 21-04-2004
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 15 <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> cebador
- <220>
- <221> misc_feature
- 25 <222> (1)..(20)
- <223> Cebador del LV hacia adelante
- <400> 1
- 30
- tgaaagcgaa agggaaacca 20
- <210> 2
- 35 <211> 15
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
- <223> cebador
- <220>
- <221> misc_feature
- 45 <222> (1)..(15)
- <223> Cebador del LV hacia atrás
- <400> 2
- 50
- ccgtgcgcg ctcag 15
- <210> 3
- 55 <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
- <223> sonda
- <220>
- <221> misc_feature
- 65 <222> (1)..(18)
- <223>
- <220>

ES 2 298 745 T3

```

<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> Sonda del LV
5
<400> 3

      ctctctcgac gcaggact
10
<210> 4
<211> 9613
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> plásmido
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9613)
<223> plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral RRL-MA1-lucif/GFP
25
<400> 4

      cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttatTT ttctaaatac      60
      attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccttgata aatgcttcaa taatattgaa      120
30      aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat      180
      tttgccttcc tgtttttggct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc      240
      agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga      300
35      gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg      360
      cggattattc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc      420
      agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag      480
40      taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc      540
      tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg      600
      taactcgctt tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg      660
      acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcaactac      720
45      ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac      780
      cacttctgcg ctcgccctt cgggctggtt ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg      840
      agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg      900
50      tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg      960
      agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac      1020
      tttagattga tttaaaactt catTTTTaat ttaaaggat ctaggtgaag atcctttttg      1080
      ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg      1140
55      tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc      1200
      aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc      1260
      tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt      1320
60      agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc      1380
      taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact      1440
      caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac      1500
65      agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag      1560
      aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaacg ggcagggtcg      1620

```

18

ES 2 298 745 T3

gaacaggaga ggcacagagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatcct tatagtcctg 1680
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 1740
 5 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 1800
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920
 10 aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 1980
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggctcgta 2100
 15 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 2160
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttaat 2220
 gtagtcttat gcaatactct tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 2280
 20 cttacaagga gaaaaaagc accgtgcatg ccgattgggt gaagtaaggt ggtacgatcg 2340
 tgccctatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 2400
 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacggg tctctctggt 2460
 25 tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttaagcctc 2520
 aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta 2580
 actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt ggcgccgaa 2640
 30 cagggacctg aaagcgaaag ggaaccaga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga 2700
 agcgcgcacg gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgccaacaaa ttttgactag 2760
 cggaggctag aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag 2820
 35 atcgcgatgg gaaaaaattc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca 2880
 tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac 2940
 atcagaaggc tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga 3000
 40 agaacttaga tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga 3060
 gataaaagac accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac 3120
 caccgcacag caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt 3180
 45 ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca 3240
 ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt 3300
 50 tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggccc agcctcaatg acgctgacgg 3360
 tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta 3420
 ttgaggcgca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa 3480
 55 gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct 3540
 ctggaaaact catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc 3600
 tggaaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca 3660

60

65

ES 2 298 745 T3

caagcttaat acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag 3720
 aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc 3780
 5 tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt 3840
 ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga 3900
 cccacctccc aacccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag 3960
 10 agagagacag agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggatc cggttaactt 4020
 ttaaaagaaa aggggggatt ggggggtaca gtgcagggga aagaatagta gacataatag 4080
 caacagacat acaaaactaa gaattacaaa aacaaattac aaaaattcaa aattttatcg 4140
 15 atcacgagac tagcctcgag agatctgatc ataatcagcc ataccacatt tgtagaggtt 4200
 ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca 4260
 attgtgtgtg ttaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaataaagg caatagcatc 4320
 acaaatcca caaataaggc attttttca ctgcattcta gttttggttt gtccaaactc 4380
 atcaatgat cttatcatgt ctggatctca aatccctcgg aagctgcgcc tgtcttaggt 4440
 25 tggagtgata catttttatc acttttacc gtctttggat taggcagtag ctctgacggc 4500
 cctcctgtct taggttagtg aaaaatgtca ctctcttacc cgtcattggc tgtccagctt 4560
 agctcgcagg ggaggtggtc tggatcctct agaattacac ggcgatcttt ccgcccttct 4620
 30 tggcctttat gaggatctct ctgatttttc ttgcgtcgag tttccggta agacctttcg 4680
 gtacttcgtc cacaaacaca actcctccgc gcaacttttt cgcggttgtt acttgactgg 4740
 ccacgtaat cacgatctct tttccgtca tcgtctttcc gtgtccaaa acaacaacgg 4800
 35 cggcgggaag ttcaccggcg tcatcgtcgg gaagacctgc gacacctgcg tcgaagatgt 4860
 tggggtgttg gagcaagatg gattccaatt cagcgggagc cacctgatag cctttgtact 4920
 taatcagaga cttcagggcg tcaacgatga agaagtgtc gtcttcgtcc cagtaagcta 4980
 40 tgtctccaga atgtagccat ccaccttgt caatcaaggc gttggtcgct tccggattgt 5040
 ttacataacc ggacataatc ataggacctc tcacacacag ttcgcctctt tgattaacgc 5100
 ccagcgtttt cccggtatcc agatccacaa ccttcgcttc aaaaaatgga acaactttac 5160
 45 cgaccgcgcc cggtttatca tccccctcgg gtgtaatcag aatagctgat gtagtctcag 5220
 tgagcccata tccttgctg atacctggca gatggaacct cttggcaacc gttccccga 5280
 50 cttccttaga gaggggagcg ccaccagaag caatttcgtg taaattagat aaatcgatt 5340
 tgtcaatcag agtgcttttg gcgaagaagg agaatagggt tggcaccagc agcgcacttt 5400
 gaatcttgta atcctgaagg ctctcagaa acagctcttc ttcaaatcta tacattaaga 5460
 55 cgactcgaat tccacatatt aaatatccga gtgtagtaaa cattccaaaa ccgtgatgga 5520
 atggaacaac acttaaaatc gcagtatccg gaatgatttg attgccaaaa ataggatctc 5580
 tggcatgcga gaatctcacg caggcagttc tatgaggcag agcgacacct ttaggcagac 5640
 60 cagtagatcc agaggagttc atgatcagtg caattgtctt gtccctatcg aaggactctg 5700

65

ES 2 298 745 T3

gcacaaaatc gtattcatta aaaccgggag gtagatgaga tgtgacgaac gtgtacatcg 5760
 actgaaatcc ctggtaatcc gttttagaat ccatgataat aatTTTTTg atgattggga 5820
 5 gctTTTTTg cacgttcaaa atTTTTTgca acccTTTTt ggaaacgaac accacggtag 5880
 gctgcgaaat gcccatactg ttgagcaatt cacgttcatt ataaatgtcg ttcgcgggcg 5940
 caactgcaac tccgataaat aacgcgcccc acaccggcat aaagaattga agagagTTTT 6000
 10 cactgcatac gacgattctg tgatttgat tcagcccata tcgTTTcata gcttctgcca 6060
 accgaaacgga catttcgaag tactcagcgt aagtgatgtc cacctcgata tgtgcatctg 6120
 taaaagcaat tgttccagga accagggcgt atctcttcat agccttatgc agttgctctc 6180
 15 cagcggttcc atcttccagc ggatagaatg gcgccgggcc tttctttatg tttttggcgt 6240
 cttccatggt gaattccgcg gaggctggat cggTcccggT gtcttctatg gaggtcaaaa 6300
 cagcgtggat ggcgtctcca ggcgatctga cggttcacta aacgagctct gcttatatag 6360
 20 gcctcccacc gtacacgcct accctcgaga agcttgatat cgaattcca cggggttggg 6420
 gttgcgcctt ttccaaggca gccctgggtt tgcgcaggga cgcggctgct ctgggcgtgg 6480
 25 ttccgggaaa cgcagcggcg ccgaccctgg gtctcgcaca ttcttcacgt ccgttcgag 6540
 cgtcaccggg atcttcgccc ctaccctgtg gggcccccg gcgacgctc ctgctccgcc 6600
 cctaagtcgg gaaggttctt tgcggttcgc ggcgtgccgg acgtgacaaa cggaaagccgc 6660
 30 acgtctcact agtaccctcg cagacggaca gcgccaggga gcaatggcag cgcgccgacc 6720
 gcgatgggct gtggccaata gcggctgctc agcggggcgc gccgagagca gcggccggga 6780
 aggggcgggT cgggaggcgg ggtgtggggc ggtagtgtgg gccctgttcc tgcccgcgcg 6840
 35 gtgttccgca ttctgcaagc ctccggagcg cacgtcggca gtcggctccc tcgttgaccg 6900
 aatcaccgac ctctctccc agggggatcc accggtcgc accatggtga gcaagggcga 6960
 ggagctgttc accggggtgg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca 7020
 40 caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa 7080
 gttcatctgc accaccggca agctgccgt gccctggccc accctcgtga ccaccctgac 7140
 ctacggcgtg cagtgttca gccgctacc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa 7200
 45 gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa 7260
 ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct 7320
 gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta 7380
 50 caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt 7440
 caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa 7500
 caccctcatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc 7560
 55 cgccctgagc aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgctgg agttcgtgac 7620
 cgccgccggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag taaagcggcc gcgtcgacaa 7680
 60 tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc 7740

65

ES 2 298 745 T3

5 ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat 7800
 ggctttcatt ttctcctcct tgtataaatc ctgggtgctg tctctttatg aggagtgtg 7860
 10 gcccgttgtc aggcaacgtg gcgtgggtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg 7920
 ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat 7980
 tgccacggcg gaactcatcg ccgctgcct tgcctgctg tggacagggg ctcggctgtt 8040
 15 gggcactgac aattccgtgg tgttgtcggg gaagctgacg tcctttccat ggctgctcgc 8100
 ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa 8160
 tccagcggac ctctctccc gcggcctgct gccggctctg cggcctctt cgcgtcttcg 8220
 20 ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgctg gaattcgagc 8280
 tcggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa 8340
 gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaacgaa gacaagatct gctttttgct 8400
 25 tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg 8460
 aaccactgc ttaagcctca ataaagctt ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgcccgt 8520
 ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctgagacct tttagtcagt gtggaaaatc 8580
 30 tctagcagta gtagttcatg tcactctatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga 8640
 atatcagaga gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat 8700
 agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgc 8760
 35 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgcccta actccgcca 8820
 gttccgcca ttctccgcc catggctgac taatttttt ttttatgca gaggccgagg 8880
 ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggccctaggct 8940
 40 tttgcgtcga gacgtaccca attcgcccta tagtgagtcg tattacgcg ctcactggc 9000
 cgctgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc 9060
 agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc 9120
 45 ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcgacgc ccctgtagcg gcgcattaag 9180
 cgcggcgggt gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgtaca cttgccagcg ccctagcgc 9240
 cgctccttcc gctttcttcc ctctcttct cgcacgttc gccggcttcc cccgtcaagc 9300
 50 tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa 9360
 aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag tggccatcg ccctgataga cggtttttcg 9420
 ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtgactc ttgttccaaa ctggaacaac 9480
 actcaacctt atctcgtctt attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta 9540
 55 ttggttaaaa aatgagctga tttacaataa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac 9600
 gtttacaatt tcc 9613

<210> 5

60 <211> 9380

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> plásmido

<220>

ES 2 298 745 T3

<221> misc_feature
 <222> (1)..(9380)
 <223>
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9380)
 10 <223> plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA1-GFP/de ItaLNGFR
 <400> 5

15	cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac	60
	attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa	120
	aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat	180
20	tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc	240
	agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga	300
	gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg	360
25	cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc	420
	agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag	480
	taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc	540
30	tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg	600
	taactcgcct tgatcgttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaac gacgagcgtg	660
	acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac	720
35	ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac	780
	cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg	840
	agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg	900
40	tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg	960
	agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac	1020

45

50

55

60

65

ES 2 298 745 T3

5 tttagattga tttaaaaactt catttttaaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg 1080
 ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcggt ccactgagcg tcagaccccg 1140
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 1260
 10 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380
 taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 1440
 15 caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac 1500
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560
 aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccgtaagc ggcagggctc 1620
 20 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctc 1680
 tcgggtttcg ccaccttga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcgga 1740
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 1800
 25 ttgctcatat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920
 aggaagcggg agagcgcca atacgcaaac cgctctccc cgcgcttgg ccgattcatt 1980
 30 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgt 2100
 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gacctgatt 2160
 35 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttggc 2220
 cattgcatac gttgtatcca tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaacat 2280
 taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggctat 2340
 40 tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg 2400
 gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 2460
 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact 2520
 45 tggcagtaca tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 2580
 aatggcccgc ctggcattat gccagtaga tgaccttatg ggactttcct acttggcagt 2640
 50 acatctacgt attagtcatc gctattacca tggatgagc gttttggcag tacatcaatg 2700
 ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg 2760
 ggagtttgtt ttggaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc 2820
 55 cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt 2880
 tagtgaaccg gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 2940
 agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 3000
 60 ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa 3060

65

ES 2 298 745 T3

aatctctagc agtggcgccc gaacagggac ctgaaagcga aagggaaacc agagctctct 3120
 5 cgacgcagga ctcggttgc tgaagcgcgc acggcaagag gcgaggggcg gcgactggtg 3180
 agtacgcaa aaattttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc 3240
 agtattaagc gggggagaat tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga 3300
 10 aagaaaaaat ataaattaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca 3360
 gttaatcctg gcctgttaga aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa 3420
 ccatcccttc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 3480
 15 tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag 3540
 gaagagcaaa acaaaagtaa gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg 3600
 aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat 3660
 20 tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag 3720
 agcagtggga ataggagctt tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg 3780
 cgcagcctca atgacgctga cggtagaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca 3840
 25 gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 3900
 gggcatcaag cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca 3960
 gctcctgggg atttgggggt gctctgaaa actcatttgc accactgctg tgccttgaa 4020
 30 tgctagtgg agtaataaat ctctggaaca gattggaatc acacgacctg gatggagtgg 4080
 gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta atacactcct taattgaaga atcgcaaaac 4140
 cagcaagaaa agaatgaaca agaattattg gaattagata aatgggcaag tttgtggaat 4200
 35 tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat ataaaattat tcataatgat agtaggaggc 4260
 ttggtagggt taagaatagt ttttgctgta ctttctatag tgaatagagt taggcagggg 4320
 tattcaccat tatcgtttca gaccacctc ccaaccccgga ggggacccga caggcccgaa 4380
 40 ggaatagaag aagaagggtg agagagagac agagacagat ccattcgatt agtgaacgga 4440
 tctcgacggt atcggttaac ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg 4500
 45 gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt 4560
 acaaaaattc aaaattttat cgatcacgag actagcctcg agagatctga tcataatcag 4620
 ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa 4680
 50 cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttgg tttattgcag cttataatgg 4740
 ttacaaataa ggcaatagca tcacaaattt cacaaataag gcattttttt cactgcattc 4800
 tagttttggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatct caaatccctc 4860
 55 ggaagctgcg cctgtcttag gttggagtga tacattttta tcacttttac ccgtctttgg 4920
 attaggcagt agctctgacg gccctcctgt cttaggttag tgaaaaatgt cactctctta 4980
 cccgtcattg gctgtccagc ttagctcgca ggggaggtgg tctggatccg agctcgaatt 5040
 60 ggccgcttta cttgtacagc tcgtccatgc cgagagtgat cccggcggcg gtcacgaact 5100

65

ES 2 298 745 T3

ccagcaggac catgtgatcg cgcttctcgt tggggtcctt gctcagggcg gactgggtgc 5160
 5 tcaggtagtg gttgtcgggc agcagcacgg ggccgtcgcc gatgggggtg ttctgctggt 5220
 agtggtcggc gagctgcacg ctgccgtcct cgatgttggt gcggatcttg aagttcacct 5280
 tgatgccgtt cttctgcttg tcggccatga tatagacgtt gtggctgttg tagttgtact 5340
 10 ccagcttggt ccccaggatg ttgccgtcct ccttgaagtc gatgcccttc agctcgatgc 5400
 ggttcaccag ggtgtcggcc tcgaacttca cctcggcgcg ggtcttgtag ttgccgtcgt 5460
 ccttgaagaa gatggtgctc tcctggacgt agccttcggg catggcggac ttgaagaagt 5520
 15 cgtgctgctt catgtggtcg gggtagcggc tgaagcactg cacgccgtag gtcaggggtg 5580
 tcacgagggg gggccagggc acgggcagct tgccgggtgt gcagatgaac ttcaggggtca 5640
 gcttgccgta ggtggcatcg ccctcgcctt cgccggacac gctgaacttg tggccgttta 5700
 20 cgtcgcctgc cagctcgacc aggatgggca ccacccggg gaacagctcc tcgcccttgc 5760
 tcaccatggt gaattccgcg gaggctggat cgggtccggg gtcttctatg gaggtcaaaa 5820
 cagcgtggat ggcgtctcca ggcgatctga cggttcacta aacgagctct gcttatatag 5880
 25 gcctcccacc gtacacgcct accctcgaga agcttgatat cgaattcca cggggttggg 5940
 gttgcccctt ttccaaggca gccctgggtt tgcgcagggg cgcggctgct ctgggcgtgg 6000
 ttccgggaaa cgcagcggcg ccgaccctgg gtctcgcaca ttcttcacgt ccgttcgcag 6060
 30 cgtcaccggg atcttcggcg ctacccttgt gggcccccg gcgacgctt ctgctccgcc 6120
 cctaagtcgg gaaggttctt tgcggttcgc ggcgtgccgg acgtgacaaa cgggaagccg 6180
 35 acgtctcact agtaccctcg cagacggaca gcgccagggg gcaatggcag cgcgccgacc 6240
 gcgatgggct gtggccaata gcgctgctc agcggggcgc gccgagagca gcggccggga 6300
 aggggcgggt cgggagggcg ggtgtggggc ggtagtgtgg gccctgttcc tgccccgcg 6360
 40 gtgttccgca ttctgcaagc ctccggagcg cacgtcggca gtcggctccc tcgttgaccg 6420
 aatcaccgac ctctctccc agggggatcc cccgggctgc aggaattcgg gccgcggcca 6480
 gctccggcgg gcaggggggg cgctggagcg cagcgcagcg cagcccatc agtccgcaaa 6540
 45 gcggaccgag ctggaagtcg agcgtgccc cgggagggcg gcgatggggg caggtgccac 6600
 cggccgcgcc atggacgggc cgcgctgct gctgttgctg cttctggggg tgtcccttgg 6660
 aggtgccaag gaggcatgcc ccacaggcct gtacacacac agcggtgagt gctgcaaagc 6720
 50 ctgcaacctg ggcgaggggt tggcccagcc ttgtggagcc aaccagaccg tgtgtgagcc 6780
 ctgcctggac agcgtgacgt tctccgacgt ggtgagcgcg accgagccgt gcaagccgtg 6840
 caccgagtgc gtggggctcc agagcatgtc ggcgccgtgc gtggaggccg acgacgccgt 6900
 55 gtgccgctgc gcctacggct actaccagga tgagacgact gggcgtgctg aggcgtgccg 6960
 cgtgtgcgag gcgggctcgg gcctcgtgtt ctctgccag gacaagcaga acaccgtgtg 7020
 60 cgaggagtgc cccgacggca cgtattccga cgaggccaac cacgtggacc cgtgcctgcc 7080
 ctgcaccgtg tgcgaggaca ccgagcgcga gctccgcgag tgcacacgct gggccgacgc 7140

65

ES 2 298 745 T3

cgagtgcgag gagatccctg gccgttggat tacacgggtcc acacccccag agggctcggg 7200
 cagcacagcc cccagcacc aggagcctga ggcacctcca gaacaagacc tcatagccag 7260
 5 cacggtggca ggtgtggtga ccacagtgat gggcagctcc cagccccgtg tgacccgagg 7320
 caccaccgac aacctcatcc ctgtctattg ctccatcctg gctgctgtgg ttgtgggcct 7380
 tgtggcctac atagccttca agaggtggaa cagggggatc ctctagagtc gagtctagag 7440
 10 tcgacaatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaactatg 7500
 ttgtccctt tacgctatgt ggatacgtg cttaatgcc tttgtatcat gctattgctt 7560
 cccgtatggc tttcattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg 7620
 15 agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgtcac tgtgtttgct gacgcaacc 7680
 ccactggttg gggcattgcc accacctgtc agctccttc cgggactttc gctttcccc 7740
 20 tcctattgc cacggcggaa etcatcgcc cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc 7800
 ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgcggggaa gctgacgtcc tttccatggc 7860
 tgctcgcctg tgttgcacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac gtcccttcgg 7920
 25 ccctcaatcc agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgctg cctcttccgc 7980
 gtcttcgct tcgccctcag acgagtcgga tctcccttg ggccgcctcc ccgctggaa 8040
 ttcgagctcg gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccactt 8100
 30 tttaaaagaa aaggggggac tggaaaggct aattcactcc caacgaagac aagatctgct 8160
 ttttgcttgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta 8220
 actaggggaa ccactgctta agcctcaata aagcttgcct tgagtgttc aagtagtgtg 8280
 35 tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg 8340
 gaaaatctct agcagtagta gttcatgtca tcttattatt cagtatttat aacttgcaaa 8400
 gaaatgaata tcagagagtg agaggaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 8460
 40 aagcaatagc atcacaatc tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg 8520
 tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggctc tagctatccc gcccttaact 8580
 ccgcccagtt ccgcccttc tccgccccat ggctgactaa tttttttat ttatgcagag 8640
 45 gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc 8700
 ctaggctttt gcgtcgagac gtaccaatc cgccctatag tgagtcgtat tacgctgct 8760
 50 cactggccgt cgttttaca cgctgtgact gggaaaacc tggcgttacc caacttaatc 8820
 gccttgagc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc 8880
 gcccttcca acagttgctc agcctgaatg gcgaatggcg cgacgcgcc tgtagcggcg 8940
 55 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcggc 9000
 tagcggcgc tccttctgct tcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggcttcccc 9060
 gtcaagctct aatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg 9120
 60 acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcggcc tgatagacgg 9180

65

ES 2 298 745 T3

```

          tttttcgccc ttgacggtg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg   9240
          gaacaacact caacctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt   9300
5         cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttttaacaaaa   9360
          tattaacggt tacaatttcc                                           9380

```

```

10 <210> 6
    <211> 9718
    <212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> plásmido
    <220>
20 <221> misc_feature
    <222> (1)...(9718)
    <223>
    <220>
25 <221> misc_feature
    <222> (1)...(9718)
    <223> plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral RRL-MA2-lucif/GFP
30 <400>

```

```

          cagggtggcac ttttcgggga aatgtgctcg gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac   60
35         attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa   120
          aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat   180
          tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc   240
40         agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga   300
          gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg   360
          cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactatttctc   420
45         agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag   480
          taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc   540
          tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg   600
50         taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc catacacaac gacgagcgtg   660
          acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac   720

```

55

60

65

ES 2 298 745 T3

ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 780
 cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 840
 5 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg 900
 tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 960
 agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 1020
 10 tttagattga tttaaaactt ctttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg 1080
 ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg 1140
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200
 15 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 1260
 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380
 20 taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 1440
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac 1500
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcg gagctatgag 1560
 25 aaagcggcac gctttccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg 1620
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg 1680
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 1740
 30 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggcctt tgctggcctt 1800
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 1860
 35 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920
 aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 1980
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 40 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggctcgta 2100
 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 2160
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttaat 2220
 45 gtagtcttat gcaatactct tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 2280
 cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt ggtacgatcg 2340
 tgccctatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 2400
 50 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacggg tctctctggt 2460
 tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttaagcctc 2520
 aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggtg 2580
 55 actagagatc cctcagacc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt ggcgcccgaa 2640
 cagggacctg aaagcgaag ggaaccaga gctctctcga cgcaggactc ggcttctgta 2700
 60 agcgcgcacg gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgcaaaaa ttttgactag 2760

65

ES 2 298 745 T3

5 cggaggctag aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag 2820
 atcgcgatgg gaaaaaattc ggттаaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca 2880
 tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgttagaaac 2940
 atcagaaggc tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga 3000
 10 agaacttaga tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga 3060
 gataaaagac accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac 3120
 caccgcacag caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt 3180
 15 ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca 3240
 ccaaggcaaa gagaagagtг gtgcagagag aaaaaagagc agtgгgaata ggagctttgt 3300
 tccttgгgtt ctгgggagca gcaggaagca ctatgggсgс agcctcaatg acgctgacgg 3360
 20 tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta 3420
 ttgaggcгca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa 3480
 gaatcctggc tgtgгaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tgggгttgct 3540
 25 ctgгaaact catttgcacc actgctgtgc cttgгаatgc tagttggagt aataaatctc 3600
 tggaacagat tgгаatcaca cgacctggat ggagtgggac agagaaatta acaattacac 3660
 aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga 3720
 30 attattggaa ttagataaat gggcaagttt gtgгаattgg tttaacataa caaattggct 3780
 gtggtatata aaattattca taatgatagt aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt 3840
 tgctgtactt tctatagtga atagagttag gcagggatat tcaccattat cgtttcagac 3900
 35 ccacctcca accccgaggg gacctgacag gcccgaagga atagaagaag aaggтggaga 3960
 gagagacaga gacagatcca ttcgattagt gaacggatct cgacggtatc ggттаacttt 4020
 taaaagaaaa ggggggattg gggggтacag tgcaggggaa agaatagtag acataatagc 4080
 40 aacagacata caaactaaag aattacaaaa acaattaca aaaattcaa attttatcga 4140
 tcacgagact agcctcgaga gatctgatca taatcagcca taccacattt gtagaggттt 4200
 tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa 4260
 45 ttgtтgttgt taacttгttt attgcagctt ataatgгtta caaataaggc aatagcatca 4320
 caaatтcac aaataaggca tttttтcac tgcattctag tttгgtttg тccaaactca 4380
 tcaatgtatc ttatcatgtc тgгatctcaa atccctcгga agctgсgсct gtcttaggтt 4440
 50 ggagtгatac atttttatca cttttaccg tctttгgatt aggcagtagc tctgacggcc 4500
 ctctgtctt aggttagtga aaaatgtcac tctcttacc gtcatтgгct gtccagctta 4560
 55 gctcгcaggg gaggtгgtct гgatccctгg atatcaagaa ttcгtcctг agctcagatc 4620
 ctctagaatt acacggcgat ctttccgccc ttctтgгcct ttatgaggat ctctctgatt 4680
 tttctгcгt cgagtттtc гgтаagacct ttcгgtactt cгtccacaaa cacaactct 4740
 60 ccгcгcaact ttttcгcгgt тgttacttga ctгgccacгt aatccacgat ctctttttcc 4800

65

ES 2 298 745 T3

5 gtcacgtct ttccgtgctc caaaacaaca acggcggcgg gaagttcacc ggcgtcatcg 4860
 tcgggaagac ctgcgacacc tgcgtcgaag atgttggggt gttggagcaa gatggattcc 4920
 aattcagcgg gagccacctg atagcctttg tacttaatca gagacttcag gcggtcaacg 4980
 atgaagaagt gttcgtcttc gtcccagtaa gctatgtctc cagaatgtag ccatccatcc 5040
 10 ttgtcaatca aggcgttggg cgcttccgga ttgtttacat aaccggacat aatcatagga 5100
 cctctcacac acagttcgcc tctttgatta acgcccagcg ttttcccggt atccagatcc 5160
 acaaccttcg cttcaaaaaa tggaacaact ttaccgaccg cgcccggttt atcatcccc 5220
 15 tcgggtgtaa tcagaatagc tgatgtagtc tcagttagcc catatccttg cctgatacct 5280
 ggcagatgga acctcttggc aaccgcttcc ccgacttctt tagagagggg agcggcacca 5340
 gaagcaattt cgtgtaaatt agataaatcg tatttgtcaa tcagagtgtt tttggcgaag 5400
 20 aaggagaata gggttggcac cagcagcgc ctttgaatct tgtaatcctg aaggctcctc 5460
 agaaacagct cttcttcaaa tctatacatt aagacgactc gaaatccaca tatcaaatat 5520
 ccgagtgtag taaacattcc aaaaccgtga tggaatggaa caacacttaa aatcgcagta 5580
 25 tccggaatga tttgattgcc aaaaatagga tctctggcat gcgagaatct cacgcaggca 5640
 gttctatgag gcagagcgc acctttaggc agaccagtag atccagagga gttcatgatc 5700
 agtgcaattg tcttgccctc atcgaaggac tctggcaca aatcgattc attaaaaccg 5760
 30 ggaggtagat gagatgtgac gaacgtgtac atcgactgaa atccctggta atccgtttta 5820
 gaatccatga taataatfff ttggatgatt gggagctfff tttgcacgtt caaaatfff 5880
 tgcaaccctt ttttgaaaac gaacaccacg gtaggctgcg aaatgccat actggtgagc 5940
 35 aattcacgtt cattataaat gtcgttcgcg ggcgcaactg caactccgat aaataacgcg 6000
 cccaacaccg gcataaagaa ttgaagagag ttttactgac atacgacgat tctgtgattt 6060
 gtattcagcc catatcgfff catagcttct gccaacggaa cggacatttc gaagtactca 6120
 40 gcgtaagtga tgtccacctc gatatgtgca tctgtaaaag caattgttcc aggaaccagg 6180
 gcgtatctct tcatagcctt atgcagttgc tctccagcgg ttccatcttc cagcggatag 6240
 aatggcgcgg ggcctttctt tatgtttttg gcgtcttcca tggatgaattc cgatccccct 6300
 45 ggggagagag gtcggtgatt cgggtcaacga gggagccgac tgccgacgtg cgctccggag 6360
 gcttgagaa tgcggaacac cgcgcgggca ggaacagggc ccacactacc gccccacacc 6420
 50 ccgctcccg caccgcccct tcccggccgc tgetctcggc gcgccccgct gagcagccgc 6480
 tattggccac agcccacgac ggtcggcgcg ctgccattgc tccctggcgc tgtccgctcg 6540
 cgagggact agtgagacgt gcggcttccg tttgtcacgt ccggcacgcc gcgaaccgca 6600
 55 aggaaccttc ccgacttagg ggcggagcag gaagcgtcgc cggggggccc acaagggtag 6660
 cggcgaagat ccgggtgacg ctgcgaacgg acgtgaagaa tgtgcgagac ccagggtcgg 6720
 cgccgctgcg tttcccgaa ccacgcccag agcagccgcg tccctgcgca aaccagggc 6780
 60 tgcccttgaa aaggcgcac cccaaccccg tgggaattcg atatcaagct tgccatggtt 6840

65

ES 2 298 745 T3

5 cttttggaat ctatccaagt cttatgtaaa tgcttatgta aaccataata taaaagagtg 6900
 ctgatttttt gagtaaacct gcaacagtcc taacattctt ctctcgtgtg tttgtgtctg 6960
 ttcgccatcc cgtctccgct cgtcacttat ccttcacttt tcagagggtc cccccgaga 7020
 tcccggtcac cctcaggctg ggtcgcacaac catggtgagc aagggcgagg agctgttcac 7080
 10 cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 7140
 gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac 7200
 caccggaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca 7260
 15 gtgcttcagc cgtaccccc accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 7320
 cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacctg 7380
 cgccgaggtg aagtctgagg gcgacacctt ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 7440
 20 cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 7500
 cgtctatate atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 7560
 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca cccccatcgg 7620
 25 cgacggcccc gtgctgctgc cgcacaacca ctacctgagc acccagtccg cctgagcaa 7680
 agacccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat 7740
 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta aagcggcctc gacaatcaac ctctggatta 7800
 30 caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatggt gctcctttta cgctatgtgg 7860
 atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt tcattttctc 7920
 ctccttgat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccg ttgtcaggca 7980
 35 acgtggcgtg gtgtgcactg tgtttgtgta cgcaaccccc actggttggg gcattgccac 8040
 cacctgtcag ctcccttccg ggactttcgc tttccccctc cctattgcca cggcggaaact 8100
 catcgcgcc tcctttgccc gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca ctgacaattc 8160
 40 cgtggtggtg tcggggaagc tgacgtcctt tccatggctg ctcgcctgtg ttgccacctg 8220
 gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag cggaccttcc 8280
 tccccgccc ctgctgccgg ctctgcggcc tcttccgctt cttcgccttc gccctcagac 8340
 45 gagtcggatc tccccctggg ccgcctcccc gcctggaatt cgagctcggg acctttaaga 8400
 ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt agccactttt taaaagaaaa ggggggactg 8460
 50 gaagggctaa ttcactccca acgaagaca gatctgcttt ttgcttgtag tgggtctctc 8520
 tggttagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaacct actgcttaag 8580
 cctcaataaa gcttgccctg agtgcttcaa gtagtggtg cccgtctgtt gtgtgactct 8640
 55 ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagtagtagt 8700
 tcatgtcatc ttattattca gtatttataa cttgcaaaga aatgaatatc agagagtgag 8760
 aggaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc 8820
 60 acaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgra 8880

65

ES 2 298 745 T3

5 tcttatcatg tctggctcta gctatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc 8940
 cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg 9000
 agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc gtcgagacgt 9060
 acccaattcg ccctatagtg agtcgtatta cgcgcgctca ctggccgctg ttttacaacg 9120
 10 tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt 9180
 cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag 9240
 cctgaatggc gaatggcgcg acgcgccttg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 9300
 ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta gcgccgctc ctttcgcttt 9360
 15 cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 9420
 ccccttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgc cccaaaaaac ttgattaggg 9480
 tgatggttca cgtagtgggc catcgccttg atagacggtt tttcgccctt tgacgttggg 9540
 gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc 9600
 20 ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 9660
 gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttcc 9718
 25

<210> 7
 <211> 9490
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> plásmido
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9490)
 40 <223>
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9490)
 45 <223> plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA3-GFP/de ItaLNGFR
 <400> 7

50 caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt
 ttctaaatac 60

55
60
65

ES 2 298 745 T3

attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 120
 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattcccttt ttgcgccat 180
 5 tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 240
 agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 300
 gttttcgcctc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 360
 10 cggattatc ccgattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc 420
 agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 480
 taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc 540
 15 tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 600
 taactcgcct tgatcggttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaac gacgagcgtg 660
 acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgca actattaact ggcgaactac 720
 20 ttactctagc ttcccggca caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 780
 cacttctgct ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 840
 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggaagccc tcccgtatcg 900
 25 tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 960
 agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 1020
 tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaggat ctaggatgaag atcctttttg 1080
 30 ataactctcat gacaaaaac ccttaactg agttttcggt cactgagcg tcagaccccg 1140
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 1260
 35 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380
 40 taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 1440
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac 1500
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560
 45 aaagcggcac gcttcccga gggagaaaag cggacaggta tccggtaagc ggcagggctc 1620
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 1680
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttggt atgctcgtca gggggcgga 1740
 50 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 1800
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920
 55 aggaagcggg agagcggcca atacgcaaac cgctctccc gcgcggttg ccgattcatt 1980
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcg aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta 2100

65

ES 2 298 745 T3

5 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 2160
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttggc 2220
 cattgcatac gttgtatcca tatkataata tgtacattta tattggctca tgtccaacat 2280
 taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat 2340
 10 tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg 2400
 gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa 2460
 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact 2520
 tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 2580
 15 aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt 2640
 acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg 2700
 ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg 2760
 20 ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc 2820
 cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt 2880
 tagtgaaccg gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 2940
 25 agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 3000
 ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa 3060
 aatctctagc agtggcggcc gaacagggac ctgaaagcga aagggaaacc agagctctct 3120
 30 cgacgcagga ctcggcttgc tgaagcgcgc acggcaagag gcgagggcg gcgactggtg 3180
 agtacgcaa aaattttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc 3240
 agtattaagc gggggagaat tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga 3300
 35 aagaaaaaat ataaattaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca 3360
 gttaatcctg gcctgttaga aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa 3420
 ccatccctc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 3480
 40 tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag 3540
 gaagagcaaa acaaaaagta gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg 3600
 aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat 3660
 45 tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag 3720
 agcagtggga ataggagctt tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg 3780
 cgcagcctca atgacgctga cggtagaggc cagacaatta ttgtctggtg tagtgcagca 3840
 50 gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 3900
 gggcatcaag cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca 3960
 gctcctgggg atttggggtt gctctgaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa 4020
 55 tgctagtgtg agtaataaat ctctggaaca gatttggaaat cacacgacct ggatggagtg 4080
 ggacagagaa attaacaatt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa 4140

60

65

ES 2 298 745 T3

ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa 4200
 ttggtttaac ataacaaatt ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg 4260
 5 cttggtaggt ttaagaatag tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg 4320
 atattcacca ttatcgtttc agaccacact cccaaccccg aggggacccg acaggcccga 4380
 aggaatagaa gaagaagggt gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg 4440
 10 atctcgacgg tatcgggtaa cttttaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg 4500
 ggaaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaact aaagaattac aaaaacaaat 4560
 tacaaaaatt caaaatttta tcgatcacga gactagcctc gaggagatct gatcataatc 4620
 15 agccatacca catttgtaga ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg 4680
 aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat 4740
 ggttacaaat aaggcaatag catcacaat ttcacaaata aggcattttt ttcactgcat 4800
 20 tctagttttg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttacc atgtctggat ctcaaatccc 4860
 tcggaagctg cgcctgtctt aggttggagt gatacatttt taccactttt acccgtcttt 4920
 ggattagga gtagctctga cggccctcct gtcttaggtt agtgaaaaat gtcactctct 4980
 25 taccgctcat tggtgtcca gcttagctcg caggggaggt ggtctggatc caccatgtct 5040
 agagaatagg aacttcggaa taggaacttc gcggccgctt tacttgtaga gctcgtccat 5100
 gccgagagt atcccggcg cggtcacgaa ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc 5160
 30 gttggggtct ttgctcaggg cggactgggt gctcaggtag tggttgtcgg gcagcagcac 5220
 ggggccgctc ccgatggggg tgttctgctg gtagtggctg gcgagctgca cgctgccgct 5280
 35 ctcgatggtg tggcggatct tgaagttcac ctgatgccg ttcttctgct tgcggccat 5340
 gatatagacg ttgtggctgt ttagttagta ctccagcttg tgccccagga tgttccgctc 5400
 ctcttgaag tcgatgccct tcagctcgat gcggttcacc aggggtgtgc cctcgaactt 5460
 40 cacctcggcg cgggtcttgt agttgcccgc gtccttgaag aagatggtgc gctcctggac 5520
 gtagccttcg ggcattggcg acttgaagaa gtcgtgctgc ttcattgtgt cggggtagcg 5580
 gctgaagcac tgcacgccgt aggtcagggg ggtcacgagg gtgggcccagg gcacgggagc 5640
 45 cttgccgggt gtcagatga acttcagggg cagcttgccg taggtggcat cgccctcgcc 5700
 ctgcgggac acgctgaact tgtggccgtt tacgtcggcg tccagctcga ccaggatggg 5760
 caccaccccg gtgaacagct cctcggcctt gtcaccatg gttgtcgacc cgacctgagg 5820
 50 gtgaccggga tctgcggggg gaccctctga aaagtgaagg ataagtgacg agcggagacg 5880
 ggatggcgaa cagacacaaa cacacgagag aagaatgta ggactgttgc aagtttactc 5940
 aaaaaatcag cactctttta tattatggtt tacataagca ttacataag acttggatag 6000
 55 attccaaaag aacataggca agcttgatat cgaattcca cggggttggg gttgcgctt 6060
 ttccaaggca gccctgggtt tgcgagggg cgcggtgct ctgggcgtgg ttccgggaaa 6120
 60 cgcagcggcg ccgacctggt gtctcgaca ttcttcacgt ccgttcgag cgtcaccggg 6180

65

ES 2 298 745 T3

atcttcgccg ctacccttgt gggccccccg gcgacgcttc ctgctccgcc cctaagtcgg 6240
 gaaggttcct tgcggttcgc ggcgtgccgg acgtgacaaa cggaagccgc acgtctcact 6300
 5 agtaccctcg cagacggaca gcgccaggga gcaatggcag cgcgccgacc gcgatgggct 6360
 gtggccaata gcggctgctc agcggggcgc gccgagagca gcggccggga aggggcggtg 6420
 cgggagggcg ggtgtggggc ggtagtgtgg gccctgttcc tgcccgcgcg gtgttccgca 6480
 10 ttctgcaagc ctccggagcg cacgtcggca gtcggctccc tcgttgaccg aatcaccgac 6540
 ctctctcccc agggggatcc cccgggctgc aggaattcgg gccgcggcca gctccggcgg 6600
 gcaggggggg cgctggagcg cagcgcagcg cagccccatc agtccgcaa gcggaccgag 6660
 15 ctggaagtcg agcgcctcgg cgggagggcg gcgatggggg caggtgccac cggccgcgcc 6720
 atggacgggc cgcgcctgct gctgttgctg cttctggggg tgtcccttgg aggtgccaa 6780
 gaggcattgcc ccacaggcct gtacacacac agcggtgagt gctgcaaagc ctgcaacctg 6840
 20 ggcgagggtg tggcccagcc ttgtggagcc aaccagaccg tgtgtgagcc ctgcctggac 6900
 agcgtgacgt tctccgacgt ggtgagcgcg accgagccgt gcaagccgtg caccgagtgc 6960
 gtggggctcc agagcatgtc ggcgccgtgc gtggaggccg acgacgccgt gtgccgctgc 7020
 25 gcctacggct actaccagga tgagacgact gggcgcctgc aggcgtgccg cgtgtgcgag 7080
 gcgggctcgg gcctcgtgtt ctctgccag gacaagcaga acaccgtgtg cgaggagtgc 7140
 cccgacggca cgtattccga cgaggccaac cacgtggacc cgtgcctgcc ctgcaccgtg 7200
 30 tgcgaggaca ccgagcgcga gctccgcgag tgacacgct gggccgacgc cgagtgcgag 7260
 gagatccctg gccgttgat tacacggctc acacccccag agggctcgga cagcacagcc 7320
 cccagcacc aggagcctga ggcacctcca gaacaagacc tcatagccag cacggtggca 7380
 35 ggtgtggtga ccacagtgat ggcagctcc cagcccgtgg tgaccgagg caccaccgac 7440
 aacctcatcc ctgtctattg ctccatcctg gctgctgtgg ttgtggcct tgtggcctac 7500
 atagccttca agaggtggaa cagggggatc ctctagagtc gactctagag tcgacaatca 7560
 40 acctctggat taaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttactatg ttgctccttt 7620
 tacgctatgt ggatacgtg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc 7680
 tttcattttc tctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc 7740
 45 cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgacac tgtgtttgct gacgcaacc ccaactggtg 7800
 gggcattgcc accacctgtc agctccttcc cgggacttcc gctttcccc tccctattgc 7860
 50 cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc ggctgttggg 7920
 cactgacaat tccgtggtgt tgcggggaa gctgacgtcc tttccatggc tgctcgcctg 7980
 tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac gtcccttcgg ccctcaatcc 8040
 55 agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgcct 8100
 tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgctcc ccgcctggaa ttcgagctcg 8160
 gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa 8220

60

65

ES 2 298 745 T3

```

aaggggggac tgggaaggct aattcactcc caacgaagac aagatctgct ttttgcttgt 8280
actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac 8340
5 ccactgctta agcctcaata aagcttgctt tgagtgtctc aagtagtggtg tgcccgtctg 8400
ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct 8460
agcagtagta gttcatgtca tcttattatt cagtatttat aacttgcaaa gaaatgaata 8520
10 tcagagagtg agaggaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc 8580
atcaciaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg tttgtccaaa 8640
ctcatcaatg tatcttatca tgtctggctc tagctatccc gccccctaact ccgccagtt 8700
15 ccgccattc tccgccccat ggctgactaa tttttttat ttatgcagag gccgaggccg 8760
cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt 8820
gctcgcagac gtaccaatc cgccctatag tgagtcgtat tacgcgcgct cactggccgt 8880
20 cgttttaca cgctcgtgact gggaaaacc tggtcgttacc caacttaac gccttgagc 8940
acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca 9000
acagtgcgc agcctgaatg gcgaatggcg cgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc 9060
25 ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc 9120
tcctttcgtc tctttccctt cttttctcgc cacgttcgcc ggctttccc gtcaagctct 9180
aatcggggg ctccccttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa 9240
30 acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc 9300
tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact 9360
caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggtt ttgccgattt cggcctattg 9420
35 gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttttaaaaaa tattaacggt 9480
tacaatttcc 9490

```

```

40 <210> 8
    <211> 10086
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
45 <220>
    <223> plásmido
    <220>
    <221> misc_feature
50 <222> (1)..(10086)
    <223>
    <220>
55 <221> misc_feature
    <222> (1)..(10086)
    <223> plásmido que contiene la construcción del vector lentiviral CCL-MA4-GFP/de ItaLNGFR

```

60

65

ES 2 298 745 T3

<400> 8

	cagggtggcac ttttcgggga aatgtgCGcg gaaccCctat ttgtttattt ttctaaatac	60
5	attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa	120
	aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat	180
	tttgccttcc tgtttttgct caccCagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc	240
10	agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga	300
	gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagtcttg ctatgtggcg	360
	cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc	420
15	agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag	480
	taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc	540
	tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg	600
20	taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaac gacgagcgtg	660
	acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac	720
	ttactctage ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac	780
25	cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg	840
	agcgtgggtc tcgCGgtatc attgcagcac tggggccaga tggtaaagccc tcccgtatcg	900
	tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtcg	960
30	agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac	1020
	tttagattga tttaaaactt ctttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg	1080
	ataatctcat gaccaaaatc ctttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg	1140
35	tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc	1200
	aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc	1260
	ttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt	1320
40	agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc	1380
	taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact	1440
	caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac	1500
45	agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag	1560
	aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaaag ggcagggtcg	1620
	gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctcg	1680

50

55

60

65

ES 2 298 745 T3

tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 1740
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 1800
 5 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920
 aggaagcggg agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcggttg ccgattcatt 1980
 10 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgtg 2100
 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 2160
 15 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttggc 2220
 cattgcatac gttgtatcca tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaacat 2280
 taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat 2340
 20 tagttcatag cccatatatg gagttccgcy ttacataact tacggtaaat ggccccctg 2400
 gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgatggtt cccatagtaa 2460
 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtaggagta tttacggtaa actgccact 2520
 25 tggcagtaca tcaagtgtat catatgcca gtagcggccc tattgacgct aatgacggta 2580
 aatggcccg cctggcattat gccagtaga tgacctatg ggactttcct acttggcagt 2640
 acatctacgt attagtcac gctattacca tggtagatgc gttttggcag tacatcaatg 2700
 30 ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg 2760
 ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc 2820
 cattgacgca aatggggcgt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt 2880
 35 tagtgaaccg gggctctctt ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 2940
 agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 3000
 ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa 3060
 40 aatctctagc agtggcgccc gaacagggac ctgaaagcga aagggaaacc agagctctct 3120
 cgacgcagga ctcggcttgc tgaagcgcgc acggcaagag gcgagggcg gcgactggtg 3180
 agtacgcaa aaattttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc 3240
 45 agtattaagc gggggagaat tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga 3300
 aagaaaaaat ataaattaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca 3360
 gttaatcctg gcctgttaga aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa 3420
 50 ccatcccttc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 3480
 tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag 3540
 55 gaagagcaaa acaaaagtaa gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg 3600
 aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat 3660
 tgaaccatta ggagttagc ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag 3720

60

65

ES 2 298 745 T3

agcagtggga ataggagctt tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg 3780
 cgcagcctca atgacgctga cggtacaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca 3840
 5 gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 3900
 gggcatcaag cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca 3960
 gctcctgggg atttgggggt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa 4020
 10 tgctagtgg agtaataaat ctctggaaca gattggaatc acacgacctg gatggagtgg 4080
 gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta atacactcct taattgaaga atcgcaaaac 4140
 cagcaagaaa agaattgaaca agaattattg gaattagata aatgggcaag tttgtggaat 4200
 15 tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat ataaaattat tcataatgat agtaggaggc 4260
 ttggtagggt taagaatagt ttttgcctga ctttctatag tgaatagagt taggcagggg 4320
 tattcaccat tatcgtttca gaccacctc ccaaccccgga ggggaccgga caggcccgaa 4380
 20 ggaatagaag aagaagggtg agagagagac agagacagat ccattcgatt agtgaacgga 4440
 tctcgacggt atcggttaac ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg 4500
 gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt 4560
 25 acaaaaattc aaaattttat cgatcacgag actagcctcg agagatctga tcataatcag 4620
 ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa 4680
 cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg tttattgag cttataatgg 4740
 30 ttacaaataa ggcaatagca tcacaaattt cacaaataag gcattttttt cactgcattc 4800
 tagttttggg ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatct caaatccctc 4860
 ggaagctgag cctgtcttag gttggagtga tacattttta tcacttttac ccgtctttgg 4920
 35 attaggcagt agctctgacg gccctcctgt cttagggttag tgaaaaatgt cactctctta 4980
 cccgtcattg gctgtccagc ttagctcgca ggggaggtgg tctggatccg agctcgaatt 5040
 ggccgcttta cttgtacagc tcgtccatgc cgagagtgat cccggcggcg gtcacgaact 5100
 40 ccagcaggac catgtgatcg cgcttctcgt tggggtcttt gctcagggcg gactgggtgc 5160
 tcaggtagtg gttgtcgggc agcagcacgg ggccgtcgcc gatgggggtg ttctgctggt 5220
 agtggtcggc gagctgcacg ctgccgtcct cgatgttgtg gcggatcttg aagttcacct 5280
 45 tgatgccgtt cttctgcttg tcggccatga tataagcgtt gtggctgttg tagttgtact 5340
 ccagcttggt ccccaggatg ttgccgtcct ccttgaagtc gatgcccttc agctcgatgc 5400
 ggttcaccag ggtgtcggc tcgaacttca cctcggcggc ggtctttag tagtccgtcgt 5460
 50 ccttgaagaa gatggtgcgc tcctggacgt agccttcggg catggcggac ttgaagaagt 5520
 cgtgctgctt catgtggtcg gggtagcggc tgaagcactg cacgcccgtg gtcaggggtg 5580
 tcacgagggg gggccagggc acgggcagct tgccgggtgt gcagatgaac ttcagggta' 5640
 55 gcttgccgta ggtggcatcg ccctcggcct cgccggacac gctgaacttg tggccgttta 5700
 cgctcggctc cagctcgacc aggatgggca ccacccggg gaacagctcc tcgcccctgc 5760

60

65

ES 2 298 745 T3

5 tcaccatggt gaattccgcg gaggctggat cggccccggt gtcttctatg gaggtcaaaa 5820
 cagcgtggat ggcgtctcca ggcgatctga cggttcacta aacgagctct gcttatatag 5880
 10 gcctcccacc gtacacgcct accctcgaga agcttgatta acccgtgtcg gctccagatc 5940
 tggcctccgc gccgggtttt ggcgcctccc gcggggcgcc ccttcctcac ggcgagcgct 6000
 gccacgtcag acgaagggcg cagcgagcgt cctgatcctt ccgcccggac gctcaggaca 6060
 15 gcggcccgct gtcataaga ctcggcctta gaaccccagt atcagcagaa ggacatttta 6120
 ggacgggact tgggtgactc tagggcactg gttttctttc cagagagcgg aacaggcgag 6180
 gaaaagtagt cccttctcgg cgattctcgg gagggatctc cgtggggcgg tgaacgccga 6240
 20 tgattatata aggacgcgcc ggggtgtggca cagctagttc cgtcgcagcc gggatttggg 6300
 tcgctggtct tgtttgtgga tcgctgtgat cgtcacttgg tgagttgcgg gctgctgggc 6360
 tggccggggc tttcgtggcc gccggggcgc tcggtgggac ggaagcgtgt ggagagaccg 6420
 25 ccaagggctg tagtctgggt ccgcgagcaa ggttgcctg aactgggggt tggggggagc 6480
 gcacaaaatg gcggctgttc ccgagctctg aatggaagac gcttghtaagg cgggctgtga 6540
 ggtcgttgaa acaaggtggg gggcatggtg ggcggcaaga acccaaggtc ttgaggcctt 6600
 30 cgctaatacg ggaaagctct tattcgggtg agatgggctg gggcaccatc tggggaccct 6660
 gacgtgaagt ttgtcactga ctggagaact cgggtttgtc gtctggttgc gggggcgga 6720
 gttatgcggt gccgttgggc agtgcacccg tacctttggg agcgcgcgcc tcgtcgtgtc 6780
 gtgacgtcac ccgttctgtt ggcttataat gcagggtggg gccacctgcc ggtagggtgtg 6840
 cggtaggctt ttctccgtcg caggacgcag ggttcgggcc tagggtaggc tctcctgaat 6900
 35 cgacaggcgc cggacctctg gtgaggggag ggataagtga ggcgtcagtt tctttggctc 6960
 gttttatgta cctatcttct taagtagctg aagctccggt tttgaactat gcgctcgggg 7020
 ttggcgagtg tgttttgtga agttttttag gcacctttt aaatgtaatc atttgggtca 7080
 40 atatgtaatt ttcagtgtta gactagtaaa ttgtccgcta aattctggcc gtttttggct 7140
 tttttgttag acgaagcttg ggctgcagga attcgggccg cggccagctc cggcgggcag 7200
 ggggggcgct ggagcgcagc gcagcgcagc cccatcagtc cgcaaagcgg accgagctgg 7260
 45 aagtcgagcg ctgccgcggg aggcgggcga tgggggcagg tgccaccggc cgcgccatgg 7320
 acgggccgcg cctgctgctg ttgctgctt cgggggtgtc ccttggaggt gccaggag 7380
 catgccccac aggctgtac acacacagcg gtgagtgtg caaagcctgc aacctgggcg 7440
 50 agggtgtggc ccagccttgt ggagccaacc agaccgtgtg tgagccctgc ctggacagcg 7500
 tgacgttctc cgacgtgggt agcgcgaccg agccgtgcaa gccgtgcacc gagtgcgtgg 7560
 ggctccagag catgtcggcg ccgtgctgtg aggccgacga cgccgtgtgc cgctgcgcct 7620
 55 acggctacta ccaggatgag acgactgggc gctgcgaggc gtgccgcgtg tgcgaggcgg 7680
 gctcgggcct cgtgttctcc tgccaggaca agcagaacac cgtgtgcgag gagtgccccg 7740
 acggcacgta ttccgacgag gcccaaccag tggaccctg cctgccctgc accgtgtgcg 7800

60

65

ES 2 298 745 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

aggacaccga gcgccagctc cgcgagtgca cacgctgggc cgacgccgag tgcgaggaga 7860
 tccctggccg ttggattaca cgggccacac ccccagaggg ctcggacagc acagccccca 7920
 gcaaccagga gcctgaggca cctccagaac aagacctcat agccagcacg gtggcagggtg 7980
 tggtgaccac agtgatgggc agctcccagc ccgtggtgac ccgaggcacc accgacaacc 8040
 tcattccctgt ctattgctcc atcctggctg ctgtggttgt gggccttgtg gcctacatag 8100
 ccttaagag gtggaacagg gggatcctct agagtgcagt ctagagtcga caatcaacct 8160
 ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattccta actatgttgc tccttttacg 8220
 ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta ttgcttcccg tatggctttc 8280
 attttctcct ccttgataa atcctggttg ctgtctcttt atgaggagt ttggcccgtt 8340
 gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg tttgctgacg caacccccac tggttggggc 8400
 attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt tccccctccc tattgccacg 8460
 gcggaactca tcgccgctg ccttgcccgc tgctggacag gggctcggct gttgggact 8520
 gacaattccg tgggtgtgtc ggggaagctg acgtcctttc catggctgct cgcctgtgtt 8580
 gccacctgga ttctgcccgg gacgtccttc tgctacgtcc cttcggccct caatccagcg 8640
 gaccttcctt cccgcggcct gctgccggct ctggggcctc ttccgcgtct tcgccttcgc 8700
 cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc ctggaattcg agctcggtag 8760
 ctttaagacc aatgacttac aaggcagctg tagatcttag ccacttttta aaagaaaagg 8820
 ggggactgga agggctaatt cactcccaac gaagacaaga tctgcttttt gcttgtagctg 8880
 ggtctctctg gtagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaaccac 8940
 tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt 9000
 gtgactctgg taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca 9060
 gtatgagttc atgtcatctt attattcagt atttataact tgcaaagaaa tgaatatcag 9120
 agagtgagag gaacttgttt attgcagctt ataatggtta caataaagc aatagcatca 9180
 caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca 9240
 tcaatgtatc ttatcatgtc tggctctagc tatcccggcc ctaactccgc ccagttccgc 9300
 ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc 9360
 ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggccttttt ggaggcctag gcttttgcgt 9420
 cgagacgtac ccaattcgcc ctatagtgag tcgtattacg cgcgctcact ggccgtcgtt 9480
 ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagacat 9540
 ccccccttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccga ccgatcgccc ttcccaacag 9600
 ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcgac gcgccctgta gcggcgctt aagcgcggcg 9660
 ggtgtggtgg ttacgcgag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct 9720
 ttgcgtttct tcccttctt tctgcaccg ttcgccggct tccccgta agctctaaat 9780
 cgggggctcc ctttaggggt ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt 9840

ES 2 298 745 T3

gattagggtg atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg 9900
acgttggagt ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac 9960
5 cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta 10020
aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca 10080
atttcc 10086

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65