



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 346 219**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/79 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04751078 .9**

⑨6 Fecha de presentación : **04.05.2004**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1692290**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

⑤4 Título: **Vectores plasmídicos de clonación de ADN y procedimientos para su uso.**

③0 Prioridad: **09.10.2003 US 682764**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2010

⑦3 Titular/es: **Intrexon Corporation**
1872 Pratt Drive VTCRC Lab, Suite 1400
Blackburg, Virginia 24060, US

⑦2 Inventor/es: **Reed, Thomas, D.**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Vectores plasmídicos de clonación de ADN y procedimientos para su uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los vectores de clonación plasmídicos y al uso de vectores de clonación plasmídicos para construir constructos de ADN o transgenes.

10 **Antecedentes de la invención**

El fundamento de la biología molecular es la tecnología de ADN recombinante, que en el presente documento se puede resumir como la modificación y la propagación de ácidos nucleicos con el propósito de estudiar la estructura y la función de los ácidos nucleicos y sus productos proteicos.

15 Los genes individuales, las regiones reguladoras génicas, las subpoblaciones de genes y, de hecho, los cromosomas enteros dentro de los que están contenidos los anteriores, están todos ellos compuestos por secuencias de nucleótidos bicatenarias antiparalelas que convencionalmente se identifican por las iniciales A, T, G y C. Estas secuencias de ADN, así como las secuencias de ADNc derivadas de las moléculas de ARNm, pueden fragmentarse en fragmentos
20 distintos, aislarse e insertarse en un vector, tal como un plásmido bacteriano, para estudiar los productos génicos. Un plásmido es una pieza de ADN extracromosómico derivado originalmente de bacterias y que se puede manipular y reintroducir en una bacteria huésped con el propósito de estudiar o producir un producto génico. El ADN de un plásmido es similar a todo el ADN cromosómico en cuanto a que está compuesto por los mismos nucleótidos A, T, G y C que codifican genes y regiones reguladoras de los genes, no obstante, es una molécula relativamente pequeña
25 compuesta por menos de aproximadamente 30.000 pares de bases o 30 kilobases (kb). Además, los pares de bases nucleotídicos de un plásmido bicatenario forma una molécula circular, lo que también distingue al ADN del plásmido del ADN cromosómico.

Los plásmidos potencian el rápido intercambio de material genético entre organismos bacterianos y permiten la
30 adaptación rápida a los cambios ambientales, tales como temperatura, suministro de alimentos y otros retos. Cualquier plásmido adquirido debe expresar un gen o genes que contribuyan a la supervivencia del huésped o, de lo contrario, el organismo lo destruirá o desechará dado que el mantenimiento de plásmidos innecesarios sería un uso derrochador de los recursos. Una población clonal de células contiene material genético idéntico, incluidos todos los plásmidos que podría alojar. El uso de un vector de clonación plasmídico con un inserto de ADN en tal población clonal de las
35 células huésped amplificará la cantidad disponible del ADN de interés. El ADN clonado de este modo se puede aislar y recuperar para su posterior manipulación en las etapas requeridas para construir un constructo de ADN. Por tanto, se puede apreciar que los vectores de clonación plasmídicos son herramientas útiles en el estudio de la función génica.

Mientras que algunos elementos encontrados en los plásmidos son naturales, otros se han producido mediante
40 ingeniería para potenciar la utilidad de los plásmidos como vectores de ADN. Estos incluyen genes de resistencia a antibióticos o a sustancias químicas y un sitio de clonación múltiple (MCS) entre otros. Cada uno de estos elementos tiene un papel en la presente invención, así como en la técnica anterior. La descripción del papel que desempeña cada elemento destacará las limitaciones y demostrará la utilidad de la presente invención.

Un gen de transmisión plasmídica particularmente útil que puede adquirir un huésped es uno que conferiría re-
45 sistencia a antibióticos. En la práctica diaria de la tecnología del ADN recombinante, los genes de resistencia a antibióticos se explotan como elementos de selección positiva o negativa que potencian preferentemente el cultivo y la amplificación del plásmido deseado sobre los de los otros plásmidos.

Con el fin de que pueda ser mantenido por un huésped bacteriano, un plásmido también debe contener un segmento
50 de secuencias que dirigen al huésped a duplicar el plásmido. Las secuencias conocidas como el elemento origen de replicación (ORI) dirigen al huésped para usar sus enzimas celulares para hacer copias del plásmido. Cuando tal bacteria se divide, cada una de las células hijas conservará una copia o copias de cualquiera de dichos plásmidos. Ciertas cepas de la bacteria *E. coli* se han derivado para maximizar esta duplicación de modo que se producen más de
55 300 copias por bacteria. De este modo, se puede potenciar el cultivo de un plásmido deseado.

Otro elemento esencial en cualquier vector de clonación es una localización para la inserción de los materiales
genéticos de interés. Este es un elemento sintético que se ha sometido a ingeniería dentro de plásmidos “salvajes”, de modo que se confiere utilidad como vector de clonación. Todo vector de clonación plasmídico típico disponible
60 comercialmente contiene al menos una de estas regiones, conocida como sitio de clonación múltiple (MCS). Un MCS normalmente comprende secuencias nucleotídicas que pueden fragmentarse por la acción de una sola o de una serie de enzimas endonucleasas de restricción (en lo sucesivo denominadas “enzimas de restricción”), cada una de ellas tiene una secuencia de reconocimiento y un patrón de escisión distintos. Las denominadas secuencias de reconocimiento (que se denominan “sitios” de la enzima de restricción) codificadas en la molécula de ADN comprenden una secuencia
65 palindrómica bicatenaria. Para algunas enzimas de restricción, bastan con sólo 4-6 nucleótidos para proporcionar un sitio de restricción, mientras que algunas enzimas de restricción requieren una secuencia de 8 o más nucleótidos. Por ejemplo, la enzima EcoRI reconoce la secuencia hexanucleotídica; 5' G-A-A-T-T-C 3', en la que 5' indica el extremo de la molécula conocido por consenso como el extremo “anterior” y, asimismo, 3' indica el extremo “posterior”. La

ES 2 346 219 T3

hebra complementaria de la secuencia de reconocimiento sería su hebra antiparalela, $3' \text{ G-A-A-T-T-C-}5'$. Por tanto, el sitio de reconocimiento de doble cadena puede estar representado dentro de la molécula bicatenaria más grande en la que aparece como:



10 Como muchas otras enzimas de restricción, EcoR1 no fragmenta exactamente en el eje de la simetría de la díada, sino en posiciones alejadas cuatro nucleótidos en las dos hebras de ADN entre los nucleótidos indicados por una “/”.



20 de modo que la molécula de ADN bicatenaria se fragmenta y tiene la configuración resultante de nucleótidos en los “extremos” recién formados:



30 Esta fragmentación escalonada proporciona fragmentos de ADN con términos $5'$ protruyentes. Dado que los pares A-T y G-C se forman de modo espontáneo cuando están cercanos, los extremos que protruyen como estos se denominan extremos cohesivos o adhesivos. Uno cualquiera de estos extremos puede formar puentes de hidrógeno con cualquier otro extremo complementario fragmentado con la misma enzima de restricción. Dado que cualquier ADN que contiene la misma secuencia de reconocimiento específico se cortará del mismo modo que cualquier otro ADN que contiene la misma secuencia, los extremos escindidos serán complementarios. Por tanto, los extremos de cualquier

35 molécula de ADN cortada con la misma enzima de restricción “coinciden” entre sí del mismo modo que piezas adyacentes de un puzzle “coinciden”, y pueden unirse enzimáticamente. Es esta propiedad la que permite la formación de moléculas de ADN recombinantes y permite la introducción de fragmentos de ADN extraño en los plásmidos bacterianos o en cualquier otra molécula de ADN.

40 Otro principio general que se debe considerar al construir moléculas de ADN recombinante es que todos los sitios de restricción que se encuentren dentro de una molécula se cortarán con una enzima de restricción concreta, no sólo el sitio de interés. Cuanto más grande es una molécula de ADN, mayor es la probabilidad de que vuelva a aparecer cualquier sitio de restricción. Suponiendo que todos los sitios de restricción se distribuyen de forma aleatoria a lo largo de una molécula de ADN aparecerá un sitio tetranucleotídico, de media, una vez cada 4^4 (es decir, 256)

45 nucleótidos, mientras que un sitio hexanucleotídico aparecerá una vez cada 4^6 (es decir, 4096) nucleótidos, y los sitios octanucleotídicos aparecerán una vez cada 4^8 (es decir, 114.688) nucleótidos. Por tanto, se puede apreciar con facilidad que las secuencias de reconocimiento más cortas aparecerán con frecuencia, mientras que las más largas aparecerán rara vez. Al planificar la construcción de un transgen u otra molécula de ADN recombinante, éste es un tema vital, ya que tal proyecto con frecuencia requiere el ensamblaje de varias piezas de ADN de varios tamaños. Cuanto más

50 grandes son estas piezas, mayor es la probabilidad de que los sitios que se desean usar aparezcan en varias piezas de los componentes de ADN, lo que dificulta la manipulación, como mucho.

En la presente memoria descriptiva, las enzimas de restricción frecuentes se denominan enzimas de restricción habituales y sus secuencias análogas se denominan sitios de restricción habituales. Las enzimas de restricción con

55 secuencias análogas superiores a 6 nucleótidos se denominan enzimas de restricción raras y sus sitios análogos sitios de restricción raros. Por tanto, las designaciones “raros” y “habituales” no se refieren a la abundancia o disponibilidad relativa de una enzima de restricción concreta, sino a la frecuencia de aparición de la secuencia de nucleótidos que constituyen su sitio de reconocimiento análogo dentro de cualquier molécula de ADN o fragmento aislado de una molécula de ADN o cualquier gen o su secuencia de ADN.

60 Recientemente se ha aislado una segunda clase de enzimas endonucleasas de restricción denominadas enzimas endonucleasas de anidación (HE). Las enzimas HE tienen grandes sitios de reconocimiento asimétricos (12-40 pares de bases). Los sitios de reconocimiento de las HE son extremadamente raros. Por ejemplo, el HE conocido como I-SceI tiene un sitio de reconocimiento de 18 pb ($5' \dots \text{TAGGGATAACAGGGTAAT} \dots 3'$), que se ha previsto que sólo aparezca

65 una vez cada 7×10^{10} pares de bases de secuencia aleatoria. Este índice de aparición es equivalente a sólo un sitio en 20 genomas del tamaño del de los mamíferos. La rara naturaleza de los sitios HE incrementa considerablemente la probabilidad de que un ingeniero genético pueda cortar un producto transgénico final sin alterar la integridad del transgen si los sitios HE estuvieran incluidos en localizaciones adecuadas en un vector de clonación plasmídico.

Dado que una molécula de ADN de cualquier organismo fuente se cortará de forma idéntica mediante su enzima de restricción análoga, las piezas de ADN extraño de cualquier especie se pueden cortar con una enzima de restricción, insertada en un vector plasmídico bacteriano fragmentado con la misma enzima de restricción un amplificado en una célula huésped adecuada. Por ejemplo, un gen humano puede cortarse por 2 sitios con EcoR1, aislarse el fragmento con los extremos EcoR1 y mezclarse con un plásmido que también se cortó con EcoR1 en lo que se conoce habitualmente como reacción de ligación o mezcla de ligación. En las condiciones adecuadas en la mezcla de ligación, algunos de los fragmentos génicos humanos aislados coincidirán con los extremos de las moléculas de plásmido. Estos extremos recientemente unidos se pueden unir y recircularizar enzimáticamente el plásmido, que ahora contiene su nuevo inserto de ADN. Después, la mezcla de ligación se introduce en *E. coli* u otro huésped adecuado, y los plásmidos recién sometidos a ingeniería se amplificarán a medida que la bacteria se divide. De este modo se puede obtener un número relativamente grande de copias del gen humano y se puede recolectar. Estas copias de genes se pueden manipular adicionalmente con el propósito de investigación, análisis o producción de su producto génico proteico.

La tecnología de ADN recombinante con frecuencia se enmarca en la generación de los denominados “transgenes”. Los transgenes con frecuencia comprenden una variedad de materiales genéticos que derivan de uno o más organismos donantes y se introducen en un organismo huésped. Normalmente, un transgen se construye usando un vector de clonación como el punto de partida o “estructura” del proyecto y se planifica una serie de complejas etapas de clonación para ensamblar el producto final dentro de dicho vector. Los elementos de un transgen, que comprende secuencias nucleotídicas, incluyen, entre otros 1) promotor regulador y/o elementos de potenciación, 2) un gen que se expresará como una molécula de ARNm, 3) elementos de ADN que proporcionan estabilización del mensaje del ARNm, 4) secuencias nucleotídicas que simulan regiones génicas intrónicas de mamífero, y 5) señales para el procesamiento del ARNm, tal como la cola de poli-A que se añade al extremo de los ARNm naturales. En algunos casos, un diseño experimental puede requerir la adición de señales de localización para proporcionar transporte al producto génico a una localización subcelular concreta. Cada uno de estos elementos es un fragmento de una molécula de ADN más grande que se ha cortado de un genoma donante o, en algunos casos, sintetizarse en un laboratorio. Cada pieza está ensamblada con las otras en un orden preciso y orientación 5’-3’ en un vector de clonación plasmídico.

El promotor de cualquier gen se puede aislar como un fragmento de ADN y colocarse dentro de una molécula sintética, tal como un plásmido, para dirigir la expresión de un gen deseado, suponiendo que se pueden proporcionar las condiciones necesarias para la estimulación del promotor de interés. Por ejemplo, las secuencias promotoras del gen de la insulina se pueden aislar, introducir en un vector de clonación plasmídico junto con un gen indicador y usarse para estudiar las condiciones requeridas para la expresión del gen de la insulina en un tipo celular adecuado. Como alternativa, el promotor del gen de la insulina puede unirse con la secuencia codificadora de la proteína de cualquier gen de interés en un vector de clonación plasmídico y usarse para dirigir la expresión del gen de interés en células que expresan insulina, suponiendo que todos los elementos necesarios están presentes dentro del transgen de ADN construido de este modo.

Un gen indicador es un componente particularmente útil de algunos tipos de transgenes. Un gen indicador comprende secuencias nucleotídicas que codifican una proteína que se expresará bajo la dirección de un promotor concreto de interés al que está unido en un transgen, lo que proporciona una respuesta bioquímica medible de la actividad promotora. Normalmente, un gen indicador es fácil de detectar o medir frente al fondo de proteínas celulares endógenas. Genes indicadores de uso habitual incluyen, entre otros, los de LacZ, proteína fluorescente verde y luciferasa, y otros genes indicadores, muchos de los cuales son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En los genomas bacterianos no hay intrones, pero se requieren para la formación adecuada de moléculas de ARNm en las células de mamífero. Por tanto, cualquier constructo de ADN para usar en sistemas de mamíferos debe tener al menos un intrón. Los intrones pueden aislarse a partir de cualquier gen de mamífero e insertarse en un constructo de ADN, junto con las señales de corte y empalme adecuadas que permiten que las células de mamífero escindan el intrón y realicen el corte y empalme de los extremos restantes del ARNm.

Un elemento de estabilización del ARNm es una secuencia de ADN que es reconocida por las proteínas de unión que protegen a algunos ARNm de la degradación. La inclusión de un elemento de estabilización de ARNm con frecuencia potenciará el nivel de expresión génica con respecto al ARNm en algunos tipos de células de mamífero y, por tanto, puede ser útil en algunos constructos de ADN o transgenes. Un elemento de estabilización de ARNm se puede aislar a partir de ADN o ARN natural o producirse de forma sintética para su inclusión en un constructo de ADN.

Una señal de localización es una secuencia de ADN que codifica una señal proteica para la ruta subcelular de una proteína de interés. Por ejemplo, una señal de localización nuclear dirigirá una proteína al núcleo; una señal de localización en la membrana plasmática la dirigirá a la membrana plasmática, etc. Por tanto, una señal de localización se puede incorporar en un constructo de ADN para estimular la translocación de su producto proteico a la localización subcelular deseada.

Una secuencia marcadora puede estar codificada en un constructo de ADN de modo que el producto proteico tenga una región única unida. Esta región única sirve como marcador proteico que puede distinguirla de su homóloga endógena. Como alternativa, puede servir como identificador que se puede detectar mediante una amplia variedad de técnicas bien conocidas en la técnica, incluidas, entre otras, RT-PCR, inmunohistoquímica o hibridación *in situ*.

Con un transgen complejo, o con uno que incluya regiones de ADN particularmente grandes, hay una mayor probabilidad de que haya múltiples sitios de reconocimiento en estas piezas de ADN. Recuérdese que las secuencias de reconocimiento que codifican un sitio hexanucleotídico cualquiera aparecen cada 4096 pb. Si una secuencia promotora tiene 3000 pb y un gen de interés de 1500 pb se debe ensamblar en un vector de clonación de 3000 pb, es estadísticamente muy probable que muchos sitios de 6 o menos nucleótidos no sean útiles, ya que todos los sitios que se pueden usar deben aparecer en sólo dos de las piezas. Además, los sitios deben aparecer en las áreas adecuadas de las moléculas adecuadas que se deben ensamblar. Además, la mayoría de los proyectos de clonación necesitarán la adición de elementos de ADN adicionales, de modo que se incrementa la complejidad de la molécula en crecimiento y la probabilidad de repetición inoportuna de cualquier sitio concreto. Dado que cualquier enzima de restricción cortará en todos sus sitios en una molécula, si reaparece un sitio de enzima de restricción se cortarán todos los sitios inoportunos junto con los sitios deseados, lo que altera la integridad de la molécula. Por tanto, cada etapa de clonación debe planearse cuidadosamente de modo que no rompa la molécula en crecimiento al cortarla con una enzima de restricción que ya se ha usado para incorporar un elemento precedente. Y, por último, cuando un investigador desea introducir un transgen completo en un organismo de mamífero, el constructo del transgen completamente ensamblado con frecuencia debe linealizarse en un sitio de restricción único en al menos un extremo del transgen, de modo que se requiere otro sitio único más que no se encuentra en ningún otro lugar en el constructo. Dado que la mayoría de los constructos de ADN están diseñados para un propósito sencillo, se ha prestado poca atención a cualquier modificación futura que podría necesitar hacerse, lo que incrementa aún más la dificultad para cambios experimentales futuros. Por ejemplo, Goderis y col. (*Plant Molecular Biology* 50: 17-27, 2002) se refiere a un conjunto de vectores realizado para la construcción de vectores de transformación vegetales mediados por *Agrobacterium* que contienen múltiples casetes de expresión y/u otros elementos, tales como regiones de fijación a la matriz. Este conjunto de vectores comprende un vector binario que tiene un sitio de clonación múltiple constituido por 13 sitios de restricción hexanucleotídicos, 6 sitios de restricción octanucleotídicos y 5 sitios para endonucleasas de anidación, y un conjunto de vectores auxiliares que permiten el ensamblaje de los casetes de expresión flanqueados por los sitios para las endonucleasas de anidación. Los casetes de expresión unidos en los vectores auxiliares se pueden transferir al vector binario.

Thomson y col. (*In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 537-542, 2002) da a conocer un conjunto de vectores similar con el fin de construir grupos de genes artificiales. Este conjunto de vectores también comprenden un vector que tiene un sitio de clonación múltiple que consta de una matriz de sitios de escisión para endonucleasas de anidación y una serie de vectores lanzadera unidireccionales que contienen varias combinaciones de sitios de restricción para endonucleasas de anidación.

Además, Asselbergs y Rival (*BioTechniques* 20: 558-562, 1996) simplemente describen la creación de un plásmido con un polilíguidador versátil en el que cuatro sitios para meganucleasa están intercalados con los sitios que se escinden mediante enzimas de restricción convencionales de tipo II de tal modo que se generan extremos romos. Además, Lin y col. (*PNAS*, vol. 100, No. 10, 5962-5967, 2003) dan a conocer un sistema de vectores para ensamblaje y transformación multigénicos. Este sistema de vectores consta de un vector aceptor basado en un cromosoma artificial competente para transformación (TAC) junto con dos vectores donantes.

Tradicionalmente, el diseño y la construcción del transgen consumen cantidades significativas de tiempo y energía por varios motivos, incluidos los siguientes:

1. Hay una amplia variedad de enzimas de restricción y de HE disponibles que generarán una serie de extremos, no obstante, la mayoría de ellos no son compatibles entre sí. Muchas enzimas de restricción, como la EcoR1, generan fragmentos de ADN con extremos 5' cohesivos protruyentes o "colas"; otras (p. ej., Pst1) generan fragmentos con colas protruyentes en 3', mientras que otras más (p. ej., Ball) fragmentan por el eje de simetría para producir fragmentos con extremos romos. Algunas de éstos serán compatibles con los extremos formados mediante escisión con otras enzimas de restricción y HE, pero la mayoría de los útiles no lo serán. Los extremos que se pueden generar con el aislamiento de cada aislamiento de fragmento de ADN deben considerarse cuidadosamente en el diseño de un constructo de ADN.
2. Los fragmentos de ADN necesarios para ensamblar un constructo de ADN o transgen deben aislarse primero de sus genomas fuente, introducirse en vectores de clonación plasmídicos y amplificarse para obtener cantidades útiles. La etapa se puede realizar usando cualquier número de vectores de clonación disponibles comercialmente o alterados de forma individual. Cada uno de los vectores de clonación plasmídicos diferentes disponibles comercialmente se desarrollaron, en su mayor parte, de forma independiente y, por tanto, contienen diferentes secuencias y sitios de restricción para los fragmentos de ADN de los genes o elementos genéticos de interés. Por tanto, los genes deben ajustarse individualmente para adaptar cada uno de estos vectores según sea necesario para cualquier conjunto dado de experimentos. Con frecuencia se necesitará alterar adicionalmente los mismos fragmentos de ADN con frecuencia para los experimentos posteriores o su clonación en otras combinaciones para nuevos constructos de ADN o transgenes. Dado que cada constructo de ADN o transgen está fabricado a medida para una aplicación concreta sin pensar o conocer cómo se usará a continuación, con frecuencia se debe "retroajustar" para las aplicaciones siguientes.
3. Además, la secuencia de ADN de cualquier gen o elemento genético dado varía y puede contener sitios de restricción internos que la convierten en incompatible con los vectores disponibles en la actualidad, de modo que se complica la manipulación. Esto es especialmente cierto cuando se ensamblan varios fragmentos de ADN en un único constructo de ADN o transgen.

Por tanto, existe la necesidad de un sistema que permita al usuario ensamblar rápidamente una serie de fragmentos de ADN en una molécula, a pesar de la redundancia de los sitios de restricción encontrados en los extremos y dentro de los fragmentos de ADN. Dicho sistema podría también proporcionar un simple medio para alterar rápidamente los extremos de los fragmentos de modo que a ellos se añaden otras secuencias de restricción. La inclusión de pares
 5 únicos u opuestos de sitios de restricción para HE potenciaría la probabilidad de tener sitios únicos para la clonación. Un sistema que también permitiría la fácil sustitución o eliminación de uno o más de los fragmentos añadiría un nivel de versatilidad actualmente disponible a los usuarios. Por tanto, un “sistema modular” que permita insertar o eliminar fragmentos de ADN dentro o fuera de las regiones “casete” flanqueadas por sitios de restricción raros dentro del vector de clonación sería especialmente útil y bienvenido al campo de la tecnología de ADN recombinante.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un vector de clonación plasmídico, en el que los elementos secuencias que co-
 15 dican una estructura molecular comprenden: Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5', un sitio cebador oligonucleotídico, un par de sitios de endonucleasas de anidación únicos en orientación opuesta flanqueando secuencias nucleotídicas aleatorias, un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación de un módulo de vector lanzadera posteriormente al par de sitios de endonucleasas de anidación únicos, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables, secuencias nucleotídicas aleatorias, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables, un sitio de endonucleasa de anidación único en una
 20 orientación directa, un par de sitios de restricción habituales no variables y únicos que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias, un sitio cebador oligonucleotídico, un par de sitios BstX I único en orientaciones opuestas (en los que la región nucleotídica variable en el sitio de reconocimiento de BstX I está definida por nucleótidos idénticos a las colas no complementarias generadas por la ordenación de dos sitios de reconocimiento de endonucleasas de anidación idénticos dispuestos en orientación complementaria inversa, un par de sitios de endonucleasas de anidación únicos en
 25 orientaciones opuestas que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias; un sitio cebador oligonucleotídico en orientación inversa, un par de sitios de restricción habituales únicos u no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias, un sitio de endonucleasas de anidación único en orientación inversa, en el que el sitio de endonucleasas de anidación es el mismo que el sitio de endonucleasas de anidación en orientación directa, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables, secuencias nucleotídicas aleatorias, una agrupación fija de sitios de restricción
 30 raros no variables, un sitio de restricción habitual único y no variable, un par de sitios de endonucleasa de anidación únicos en orientación opuesta que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias, un sitio cebador oligonucleotídico en orientación inversa y tres sitios de restricción habituales únicos y no variables.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un mapa lineal del concepto modular de la invención.

La Figura 2 es un mapa del plásmido de acoplamiento no reivindicado.

La Figura 3 es un mapa de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se
 40 pueden incluir en el MCS del plásmido de acoplamiento no reivindicado.

La Figura 4 es un mapa del plásmido de acoplamiento primario.

La Figura 5 es un mapa de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se
 45 pueden incluir en el MCS del plásmido de acoplamiento primario.

La Figura 6 es un mapa del plásmido vector lanzadera P no reivindicado (SVP).

La Figura 7 es un mapa del sitio de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que
 50 se pueden incluir en el MCS del SVP no reivindicado.

La Figura 8 es un mapa del plásmido vector lanzadera E no reivindicado (SVE).

La Figura 9 es un mapa del sitio de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que
 55 se pueden incluir en el MCS del SVE no reivindicado.

La Figura 10 es un mapa del vector lanzadera 3' no reivindicado (SV3).

La Figura 11 es un mapa del sitio de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción
 60 que se pueden incluir en el MCS del SV3 no reivindicado.

Breve descripción de los listados de secuencia

La SEC ID 01 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido de acoplamiento PE3 no
 65 reivindicado.

La SEC ID 02 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido de acoplamiento PE3 no reivindicado.

La SEC ID 03 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido de acoplamiento primario.

La SEC ID 04 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido de acoplamiento primario.

5 La SEC ID 05 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido SVP no reivindicado. MCS.

La SEC ID 06 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido SVP no reivindicado.

10 La SEC ID 07 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido SVE no reivindicado.

La SEC ID 08 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido SVE no reivindicado.

La SEC ID 09 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido SV3 no reivindicado.

15 La SEC ID 10 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido SV3 no reivindicado.

Definiciones de términos usados para describir la invención

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “vector de clonación” y “vector de clonación plasmídico” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a una molécula de ADN circular que contiene, como mínimo, un origen de replicación, un medio para la selección positiva de las células huésped que alojan el plásmido, tal como un gen de resistencia a antibióticos; y un sitio de clonación múltiple.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “Origen de Replicación” (ORI) se refiere a secuencias nucleotídicas que dirigen la replicación o duplicación de un plásmido dentro de una célula huésped.

30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “Sitio de clonación múltiple” hace referencia a secuencias nucleotídicas que comprenden sitios de restricción con el propósito de clonar fragmentos de ADN en un vector de clonación plasmídico.

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “clonación” se refiere al procedimiento de ligar una molécula de ADN en un plásmido y transferirla a una célula huésped adecuada para su duplicación durante la propagación del huésped.

40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “constructo de ADN” se refiere a una molécula de ADN sintetizada mediante etapas consecutivas de clonación dentro de un vector de clonación plasmídico y normalmente se usa para dirigir la expresión génica en cualquier célula huésped adecuada, tal como células cultivadas *in vitro* o un ratón transgénico *in vivo*. También se puede hacer referencia a un transgen usado para fabricar dicho ratón como un constructo de ADN, especialmente durante el periodo de tiempo cuando se diseña y sintetiza el transgen.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “vector lanzadera” se refiere a un vector de clonación plasmídica especializado usado en la invención para fabricar una molécula intermedia que modifique los extremos de un fragmento de ADN.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “plásmido de acoplamiento” se refiere a un vector de clonación plasmídico especializado usado en la invención para ensamblar fragmentos de ADN en un constructo de ADN.

50 Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “endonucleasa de restricción” o “enzima de restricción” se refieren a un miembro o miembros de una clasificación de moléculas catalíticas que se unen a una secuencia análoga de ADN y escinden la molécula de ADN en una localización precisa dentro de dicha secuencia.

55 Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “secuencia análoga” o “secuencias análogas” se refieren a la serie mínima de nucleótidos requerida para que una enzima de restricción se una a, y escinda, una molécula de ADN o gen.

60 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “fragmento de ADN” se refiere a cualquier molécula de ADN aislada, incluidos, entre otros, una secuencia codificadora de proteínas, un gen indicador, un promotor, un potenciador, un intrón, un exón, una cola de poli-A, un sitio de clonación múltiple, una señal de localización nuclear o una señal de estabilización de ARNm, o cualquier otra molécula de ADN natural o sintética. Como alternativa, un fragmento de ADN puede tener un origen completamente sintético, producido *in vitro*. Además, un fragmento de ADN puede comprender cualquier combinación de fragmentos aislados naturales o sintéticos.

65 Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “promotor génico” o “promotor” (P) se refieren a una secuencia nucleotídica requerida para la expresión de un gen.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “región potenciadora” se refiere a una secuencia nucleotídica que no se requiere para la expresión de un gen diana pero que incrementará el nivel de expresión génica en las condiciones adecuadas.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “indicador” se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica una proteína útil para monitorizar la actividad de un promotor de interés concreto.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “dominio de modificación de cromatina” (CMD) se refiere a secuencias nucleotídicas que interaccionan con una variedad de proteínas asociadas con mantener y/o alterar la estructura de la cromatina.

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “cola de poliA” se refiere a una secuencia de nucleótidos de adenina (A) que normalmente se encuentran en el extremo de moléculas de ADⁿ mensajero (ARN^m). Una señal de cola de poliA se incorpora en los extremos 3' de los constructos de ADN o transgenes para facilitar la expresión del gen de interés.

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “intrón” se refiere a las secuencias nucleotídicas de una región no codificadora de proteínas de un gen que se encuentra entre dos regiones codificadoras de proteínas o exones.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “región no traducida” (UTR) se refiere a secuencias nucleotídicas que abarcan la región no codificadora de proteínas de una molécula de ARN^m. Estas regiones no traducidas pueden residir en el extremo 5' (5' UTR) o el extremo 3' (3' UTR) de una molécula de ARN^m.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “elemento de estabilización del ARN^m” se refiere a una secuencia de ADN que es reconocida por las proteínas de unión que se piensa que protegen a algunos ARN^m de la degradación.

30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “señal de localización” (LOC) se refiere a secuencias nucleotídicas que codifican una señal para la ruta subcelular de una proteína de interés.

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “secuencia marcadora” (TAG) se refiere a secuencias nucleotídicas que codifican una región proteica única que permite su detección o, en algunos casos, que se distinga de cualquier homólogo endógena.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “sitio cebador” se refiere a secuencias nucleotídicas que sirven como moldes de ADN sobre los que los oligonucleótidos de ADN monocatenario se pueden hibridar con el fin de iniciar secuenciación de ADN, amplificación por PCR y/o transcripción de ARN.

40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “gen selector de la expresión génica en el huésped” (GEH-S) se refiere a un elemento genético que puede conferir resistencia o toxicidad a las células u organismos cuando se tratan con un antibiótico o sustancia química adecuado.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “brazo de recombinación” se refiere a secuencias nucleotídicas que facilitan la recombinación homóloga entre ADN transgénico y ADN genómico. El éxito de la recombinación requiere la presencia de un brazo de recombinación izquierdo (LRA) y un brazo de recombinación derecho (RRA) que flanquean una región de ADN transgénico que se va a incorporar en un genoma huésped mediante recombinación homóloga.

50 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “pUC19” se refiere a un vector de clonación plasmídico bien conocido para los expertos en la técnica y se puede encontrar en la base de datos NCBI Genbank con el número de registro L09137.

55 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “secuencias nucleotídicas aleatorias” se refiere a cualquier combinación de secuencias nucleotídicas que no duplican secuencias que codifican otros elementos especificados como componentes de la misma molécula.

60 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “único” se refiere a cualquier sitio de endonucleasa de restricción o de endonucleasa de anidación que no se encuentran en ningún otro lugar dentro de una molécula de ADN.

Descripción detallada de la invención

65 La presente invención es un grupo de vectores de clonación optimizados para reducir la cantidad de manipulación necesaria con frecuencia para ensamblar una variedad de fragmentos de ADN en un constructo de ADN o transgen *de novo*. El vector primario, en la presente memoria descriptiva denominado plásmido de acoplamiento, contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) con 3 grupos de sitios de restricción raros y de HE dispuestos en un patrón

ES 2 346 219 T3

lineal. Esta disposición define una arquitectura molecular que permite al usuario ensamblar múltiples insertos en un único constructo de transgen sin alterar la integridad de los elementos de ADN ya incorporados en el plásmido de acoplamiento en etapas de clonación previas.

Dos sitios de reconocimiento para al menos tres endonucleasas de anidación están colocados en orientación opuesta para flanquear tres regiones modulares con el fin de crear un sitio aceptor de casete génico que no puede autohibridar. Dado que los sitios de endonucleasas de anidación son asimétricos y no palindrómicos, es posible generar colas cohesivas protruyentes en 3' no complementarias introduciendo dos sitios de reconocimiento para endonucleasas de anidación en orientación opuesta. Por tanto, la HE I-SceI corta su sitio de reconocimiento análogo indicado por "7".

5'...TAGGGATAA/CAGGGTAAT...3',
3'...ATCCC/TATTGTCCCATTA...5'.

La colocación inversa de un segundo sitio dentro de un MCS generaría dos colas protruyentes cohesivas no complementarias:

5'...TAGGGATAA CCCTA...3'
3'...ATCCC AATAGGGAT...5'.

Esto es particularmente útil cuando es necesario subclonar transgenes más grandes en un vector. Debido al tamaño del inserto, es termodinámicamente más favorable que un vector se autohibride en lugar de aceptar un inserto grande. La presencia de colas no complementarias generadas por esta colocación de sitios de restricción proporciona fuerzas químicas que contrarrestan la inclinación termodinámica para la autoligación.

La naturaleza asimétrica de la mayoría de las colas protruyentes de HE también crea una potente herramienta de clonación cuando se usa en combinación con el sitio de la enzima de restricción BstX I (5' CCANNNN/NTGG 3'). El dominio de secuencia neutra de BstX I se puede usar para generar extremos cohesivos compatibles para dos colas protruyentes para HE inversas, mientras impide la autohibridación.

BstX I (I-Sce I Fwd.)	I-Sce I Directo	I-Sce I Inverso	BstX I (I-Sce I Inv.)
5'-CCAGATAA	CAGGGTAAT//ATTACCTGTTAT		GTGG-3'
3'-GGTC	TATTGTCCCATTA//TAATGGGAC		AATACACC-5'

Los vectores lanzadera no reivindicados contienen sitios de clonación múltiple con sitios de restricción habituales flanqueados por sitios de restricción raros y/o de HE. Los vectores lanzadera están diseñados para clonar fragmentos de ADN en los sitios de restricción habituales entre los sitios raros. Los fragmentos clonados pueden liberarse posteriormente mediante escisión por el sitio o sitios de restricción raros o de HE e incorporarse en el plásmido de acoplamiento usando el mismo sitio o sitios de restricción raros o de HE encontrados en los vectores lanzadera.

Por tanto, al contrario que los vectores de clonación convencionales, el diseño del MCS permite insertar "casetes" o módulos de fragmentos de ADN en las regiones modulares del plásmido de acoplamiento. Asimismo, cada uno se puede eliminar con facilidad usando las mismas enzimas de restricción raras y/o de HE y sustituirse con cualquier otro fragmento de ADN de interés. Esta característica permite que el usuario cambie la dirección de un proyecto experimentar rápida y fácilmente sin tener que reconstruir todo el constructo de ADN. Por tanto, los vectores de clonación plasmídicos de la presente invención permiten que el usuario clone un fragmento de ADN en un vector intermedio usando sitios de restricción habituales, creando un módulo aceptor de casetes y, después, transferir dicho fragmento al punto modular deseado en el constructo final mediante los sitios de restricción raros. Además, permite futuras alteraciones en la molécula para sustituir módulos individuales en el plásmido de acoplamiento con otros módulos casete. Las descripciones siguientes destacan las distinciones de la presente invención en comparación con la técnica anterior.

Los componentes individuales de un transgen (el potenciador del promotor P, la proteína expresada E y/o la región reguladora en 3' 3') se pueden ensamblar como módulos transferidos desde vectores lanzadera al plásmido estación de acoplamiento PE3. Si se necesitan mayores órdenes de complejidad, los transgenes ensamblados, u otras secuencias nucleotídicas, pueden transferirse a un plásmido de acoplamiento primario. Cada uno de los cinco tipos de vectores de

ES 2 346 219 T3

clonación plasmídicos se explicará con más detalla para proporcionar conocimientos de los componentes incorporados en cada uno, comenzando con el plásmido estación de acoplamiento PE3 no reivindicado más complejo y el plásmido de acoplamiento primario.

El plásmido de acoplamiento PE3 no reivindicado (Figura 2) comprende una estructura de PUC19 con las modificaciones siguientes, en las que las secuencias se numeran de acuerdo con el archivo de secuencias del pUC19 Genbank, número de registro L09137:

1. En el plásmido de acoplamiento sólo se usan las secuencias de 806 a 2617 (Afl3-Aat2),
2. El sitio BspH1 en 1729 en el pUC19 está mutado de TCATGA a GCATGA
3. El sitio Acl1 en 1493 en el pUC19 está mutado de AACGTT a AACGCT
4. El sitio Acl1 en 1120 en el pUC19 está mutado de AACGTT a CACGCT,
5. El sitio Ahd1 en pUC19 está mutado de GACNNNNNGTC a CACNNNNNGTC,
6. Las secuencias que codifican BspH1/I-Ppo 1/BspH1 se insertan en el único sitio restante BspH1 en el Puc19 tras la etapa de mutación 2 en la lista anterior.

El sitio de clonación múltiple (MCS) en el plásmido de acoplamiento PE3 no reivindicado (Figura 3) comprende los siguientes elementos secuenciales, en el orden enumerado:

1. Tres sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, Aat II, BpI y EcoO109 I),
2. Un sitio cebador de T7.
3. Un sitio único para HE (por ejemplo, I-SceI (orientación directa)),
4. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-1) (por ejemplo, Kpn I y Avr II),
5. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo promotor (por ejemplo, AsiS I y SgrA I),
6. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor de promotor/intrón (RNAS-P),
7. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la unión compartida entre la porción 3' del módulo promotor/intrón y la porción 5' del módulo de expresión (por ejemplo, PacI, AscI y MluI),
8. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor de promotor/intrón (RNAS-P),
9. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la unión de la porción 3' del módulo de expresión y la porción 5' del módulo regulador en 3' (por ejemplo, SnaB I, Not I y Sal I),
10. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor del dominio regulador en 3' (RNAS-3),
11. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo regulador 3' (por ejemplo, Swa I, Rsr II y BsiW I),
12. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-2) (por ejemplo, Xho I y Nhe I),
13. Un sitio único de HE en orientación inversa que es idéntico al del punto 3, en lo que antecede,
14. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y
15. Cuatro sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, BspE I, Pme I, Sap I y BspH I).

ES 2 346 219 T3

El plásmido de acoplamiento primario (Figura 4) se puede usar para ensamblar dos transgenes completados que se construyen primero en los plásmidos de estación de acoplamiento PE3 no reivindicados, o dos brazos de homología necesarios para construir un transgen dirigido al gen, o para introducir dos tipos de elementos de selección positiva o negativa. El sitio de clonación múltiple (MCS) en el plásmido de acoplamiento primario (Figura 5) comprende los siguientes elementos secuenciales, en el orden enumerado:

1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, Aat II, y Bln I),
2. Un sitio cebador de M13 Rev.,
3. Un par de sitios únicos de HE en orientación opuesta que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del gen selector en la expresión del genoma del huésped (RNAS-GEH-S1) (por ejemplo, PstI (orientación directa) y PstI (orientación inversa)),
4. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación de un módulo del vector lanzadera posterior al par de HE (por ejemplo, EcoRI),
5. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' de un módulo del brazo de recombinación izquierdo (por ejemplo, SgrA I y AsiA I),
6. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor del brazo de recombinación izquierdo (RNAS-LRA),
7. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo aceptor del brazo de recombinación izquierdo (por ejemplo, PacI, MluI, y AscI),
8. Un sitio único para HE (por ejemplo, I-Ceu I (orientación directa)),
9. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-1) (por ejemplo, Kpn I y Avr II),
10. Un sitio cebador de T7,
11. Un par de sitios BstX I únicos en orientación opuesta (en los que la región nucleotídica variable en el sitio de reconocimiento de BstX I está definido por nucleótidos idénticos a las colas no complementarias generadas mediante la ordenación de dos sitios de reconocimiento de HE idénticos dispuestos en orientación complementaria-inversa; por ejemplo, PstI (orientación directa) y PstI (orientación inversa)) que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del transgen completo (RNAS-PE3-),
12. Un par de sitios únicos de HE en orientación opuesta que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del transgen complejo (RNAS-PE3-2) (por ejemplo, I-SceI (orientación directa) y I-SceI (orientación inversa)),
13. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa,
14. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-2) (por ejemplo, Xho I y Nhe I),
15. Un sitio único de HE en orientación inversa que es idéntico al del punto 8, en lo que antecede,
16. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' de un módulo del brazo de recombinación derecho (por ejemplo, SnaB I, Sal I y Not I),
17. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor del brazo de recombinación derecho (RNAS-RRA),
18. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo aceptor del brazo de recombinación derecho (por ejemplo, Rsr II, Sma I y BspW I),
19. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación de un módulo del vector lanzadera antes del par de HE (por ejemplo, BspE I),

ES 2 346 219 T3

20. Un par de sitios únicos de HE en orientación opuesta que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del gen selector en la expresión del genoma del huésped (RNAS-GEH-S2) (por ejemplo, PI-Psp I (orientación directa) y PI-Psp I (orientación inversa)),

21. Un sitio cebador directo de M13 colocado en orientación inversa,

22. Tres sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, Pme I, Sap I y BspH I).

Tres vectores de clonación plasmídicos no reivindicados de la invención se conocen como vectores lanzadera. Los vectores lanzadera no reivindicados, como el PE3 no reivindicado y los plásmidos de acoplamiento primarios reivindicados, también se construyen a partir de una estructura de pUC19. Como PE3 no reivindicado y los plásmidos de acoplamiento primarios reivindicados, cada vector lanzadera no reivindicado tiene las mismas modificaciones en la estructura de pUC19 indicadas como de 1 a 6, en lo que antecede. Los vectores lanzadera (SV) individuales no reivindicados se identifican como promotor/intrón (P) del vector lanzadera, expresión (E) del vector lanzadera y regulador en 3' (3) del vector lanzadera: en lo sucesivo SVP, SVE y SV3, respectivamente. Cada uno se describe más a fondo a continuación.

20 Vector lanzadera P no reivindicado (SVP)

SVP es un vector de clonación plasmídico que se puede usar para preparar secuencias promotoras e intrones para ensamblar dentro de un constructo de transgen (Figura 6). Un ejemplo de un plásmido SVP puede comprender los siguientes elementos secuenciales:

1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, AatII, y BlnI),
2. Un sitio cebador de T7,
3. Un sitio de restricción habitual único y ni variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera posterior al sitio cebador de T7 (por ejemplo, Eco0109I),
4. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo promotor (por ejemplo, AsiSI y SgrAI),
5. Un MCS variable que comprende cualquier agrupación de sitios de restricción habituales o raros que son únicos del vector lanzadera (por ejemplo, la serie de sitios de restricción ilustrada en la Figura 7),
6. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo promotor (por ejemplo, PacI, AscI y MluI),
7. Un sitio de restricción habitual único y ni variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera anterior al sitio cebador de T3 (por ejemplo, BspEI),
8. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y
9. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, PmeI y SapI),

Vector lanzadera E no reivindicado (SVE)

Este es un vector de clonación plasmídico que se puede usar para preparar secuencias que van a ser expresadas en el transgen para ensamblar dentro de un constructo de transgen (Figura 8). Un ejemplo de un plásmido SVE puede comprender los siguientes elementos secuenciales en el MCS (Figura 9), en el orden enumerado:

1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, AatII, y BlnI),
2. Un sitio cebador de T7,
3. Un sitio de restricción habitual único y ni variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera posterior al sitio cebador de T7 (por ejemplo, Eco0109I),
4. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo de expresión (por ejemplo, PacI, AscI y MluI),

ES 2 346 219 T3

5. Un MCS variable constituido por cualquier agrupación de sitios de restricción habituales o raros que son únicos del vector lanzadera (por ejemplo, la serie de sitios de restricción ilustrada en la Figura 9),
6. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo de expresión (por ejemplo, SnaBI, NotI y SalI),
7. Un sitio de restricción habitual único y ni variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera anterior al sitio cebador de T3 (por ejemplo, BspEI),
8. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y
9. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, PmeI y SapI),

Vector lanzadera 3 no reivindicado (SV3)

Este es un vector de clonación plasmídico que se puede usar para preparar secuencias reguladoras en 3' para ensamblar dentro de un constructo de transgen (Figura 10). Un ejemplo de un plásmido SV3 puede comprender los siguientes elementos en el MCS (Figura 11), en el orden enumerado:

1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, AatII, y BlnI),
2. Un sitio cebador de T7,
3. Un sitio de restricción habitual único y ni variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera posterior al cebador de T7 (por ejemplo, Eco0109I),
4. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo regulador 3' (por ejemplo, SnaBI, NotI y SalI),
5. Un MCS variable constituido por cualquier agrupación de sitios de restricción habituales o raros que son únicos del vector lanzadera (por ejemplo, la serie de sitios de restricción ilustrada en la Figura 11),
6. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo regulador (por ejemplo, SmaI, RsrII y BsiWI),
7. Un sitio de restricción no raro único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera anterior al sitio cebador de T3 (por ejemplo, BspEI),
8. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y
9. Dos sitios de restricción no raros únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, PmeI y SapI).

Aunque la presente invención da a conocer procedimientos para construir transgenes en vectores de clonación plasmídicos, se pueden usar procedimientos similares para construir transgenes en moléculas más grandes de ADN extracromosómico, tales como cósmidos o cromosomas artificiales, incluidos cromosomas artificiales bacterianos (BAC). La amplia variedad de elementos transgénicos que se pueden incorporar en los vectores de clonación plasmídicos también permiten transferir los productos finales del transgen a una amplia variedad de organismos huésped con poca o ninguna manipulación adicional.

Como ejemplo del procedimiento de practicar la presente invención se puede construir un transgen que contiene estos elementos:

1. Secuencias nucleotídicas del promotor humano para la proteína tensioactivo C (SP-C),
2. Secuencias que codifican el producto proteico del gen de ratón del receptor beta c del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GMR β C)
3. Secuencias intrón de la betaglobina de conejo, y
4. Señal poli-A de SV40.

Las secuencias de SP-C contienen sitios BamHI internos y se pueden liberar de su plásmido parental únicamente con NotI y EcoRI. El GMR β c tiene un sitio NotI interno y se puede cortar de su plásmido parental con BamHI y

ES 2 346 219 T3

Xho1. Las secuencias intrones de la betaglobina de conejo se pueden cortar de su plásmido parental con EcoR1. La cola poli-A de SV-40 se puede cortar de su plásmido parental con Xho1 y Sac1. Dada la redundancia de varios sitios de restricción, ninguno de los plásmidos parentales se puede usar para ensamblar todos los fragmentos necesarios.

Las etapas usadas para construir el transgen deseado en el plásmido de acoplamiento PE3 no reivindicado son las siguientes:

1. Dado que Not1 y PspOMI generan extremos cohesivos compatibles, las secuencias promotoras SP-C humanas se escinden con Not1 y EcoR1 y se clonan en los sitios de PspOM1 y EcoR1 del vector lanzadera P. El producto de esta reacción se denomina pSVP-SPC.
2. Tras las etapas de propagación y recuperación bien conocidas por los expertos en la técnica, las secuencias intrónicas de la betaglobina de conejo se clonan en el sitio EcoR1 de pSVP-SPC. La orientación del intrón en el constructo intermedio resultante se verifica mediante secuenciación del producto, denominado pSVP-SPC- γ g.
3. El promotor y el intrón se escinden y aíslan como un fragmento contiguo de pSVP-SPC- γ g usando AsiS1 y Asc1. Simultáneamente, el plásmido de acoplamiento PE3 se corta con AsiS1 y Asc1 en preparación de la ligación con el segmento promotor/intrón. El fragmento promotor/intrón se liga en el plásmido de acoplamiento, se propaga y se recupera.
4. Se introduce el sitio Xho1 del fragmento GMR β c para crear un extremo 3' romo usando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. Después se clona en el sitio BamH1 y el sitio Pvu2 con extremos romos de pSVP-SPC- γ g. El plásmido resultante (pDP-SPC-GMR β c- γ g) se propagó y recuperó.
5. La etapa de clonación final es la adición de la cola de poli-A de SV-40. El fragmento poli-A del SV40 se corta con Xho1 y Sac1, como también el vector receptor pDS1-SPC-GMR β c-rb β g. Ambas piezas de ADN se purifican en gel y se recuperan. Se prepara una mezcla de ligación con una proporción molar de 10:1 entre poli-A de SV-40 y pDS1-SPC- GMR β c- γ g. Los productos de ligación se propagan y recolectan. El plásmido nuevo pDS1-SPC- GMR β c- γ g-pA contiene todos los elementos requeridos para el transgen, incluido un sitio de restricción único en el extremo 3' con el que todo el plásmido pDS1-SPC- GMR β c- γ g-pA se puede linealizar para la transfección en células eucarióticas o microinyección en el pronúcleo de un huevo fertilizado.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de clonación plasmídico, en el que los elementos secuenciales codificados comprenden

- a) dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5',
- b) un sitio cebador oligonucleotídico,
- c) Un par de sitios de endonucleasas de anidación únicos en orientación opuesta que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
- d) un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación de un módulo del vector lanzadera posterior al par de sitios de endonucleasas de anidación,
- e) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables,
- f) secuencias nucleotídicas aleatorias,
- g) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables,
- h) un sitio de endonucleasa de anidación único en una orientación directa,
- i) un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
- j) un sitio cebador oligonucleotídico,
- k) un par de sitios BstX I únicos en orientaciones opuestas, en los que la región nucleotídica variable en el sitio de reconocimiento de BstXI está definido por nucleótidos idénticos a las colas no complementarias generadas por la ordenación de dos sitios de reconocimiento de endonucleasas de anidación idénticos dispuestos en orientación complementaria-inversa,
- l) un par de sitios de endonucleasas de anidación únicos en orientaciones opuestas que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
- m) un sitio cebador oligonucleotídico en orientación inversa,
- n) un par de sitios de restricción frecuentes únicos y no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
- o) un sitio de endonucleasa de anidación único en orientación inversa, siendo el sitio de endonucleasa de anidación el mismo que el sitio de endonucleasa de anidación en una orientación directa,
- p) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables,
- q) secuencias nucleotídicas aleatorias,
- r) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables,
- s) un sitio de restricción habitual único y no variable,
- t) un par de sitios de endonucleasas de anidación únicos en orientación opuesta que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
- u) un sitio cebador oligonucleotídico en orientación inversa, y
- v) tres sitios de restricción habituales únicos y no variables.

2. El vector de clonación plasmídico de la reivindicación 1, en el que la estructura modular de los elementos secuenciales está ordenada para permitir la introducción de dos transgenes discretos, de modo que las secuencias nucleotídicas introducidas de este modo sustituyen las secuencias nucleotídicas aleatorias.

3. El vector de clonación plasmídico de la reivindicación 1, en el que la estructura modular de los elementos secuenciales está ordenada para permitir la introducción de dos regiones discretas de secuencias nucleotídicas tales como las necesarias para inducir la recombinación homóloga de un transgen para alcanzar la mutación dirigida de un gen.

ES 2 346 219 T3

4. El vector de clonación plasmídico de la reivindicación 1, en el que la estructura modular de los elementos secuenciales está ordenada para permitir la introducción de dos elementos distintos de selección positiva o negativa.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

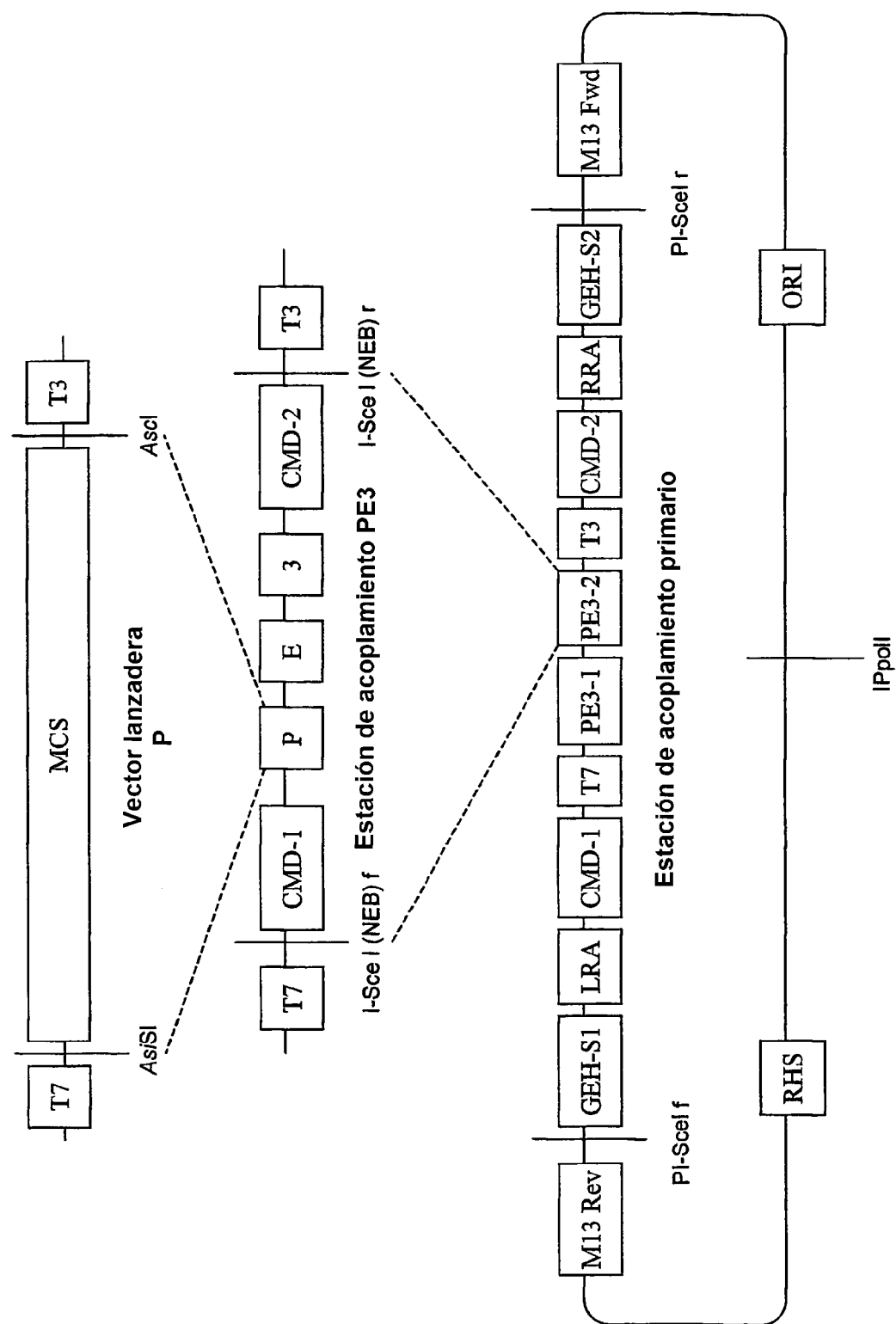


Figura 1

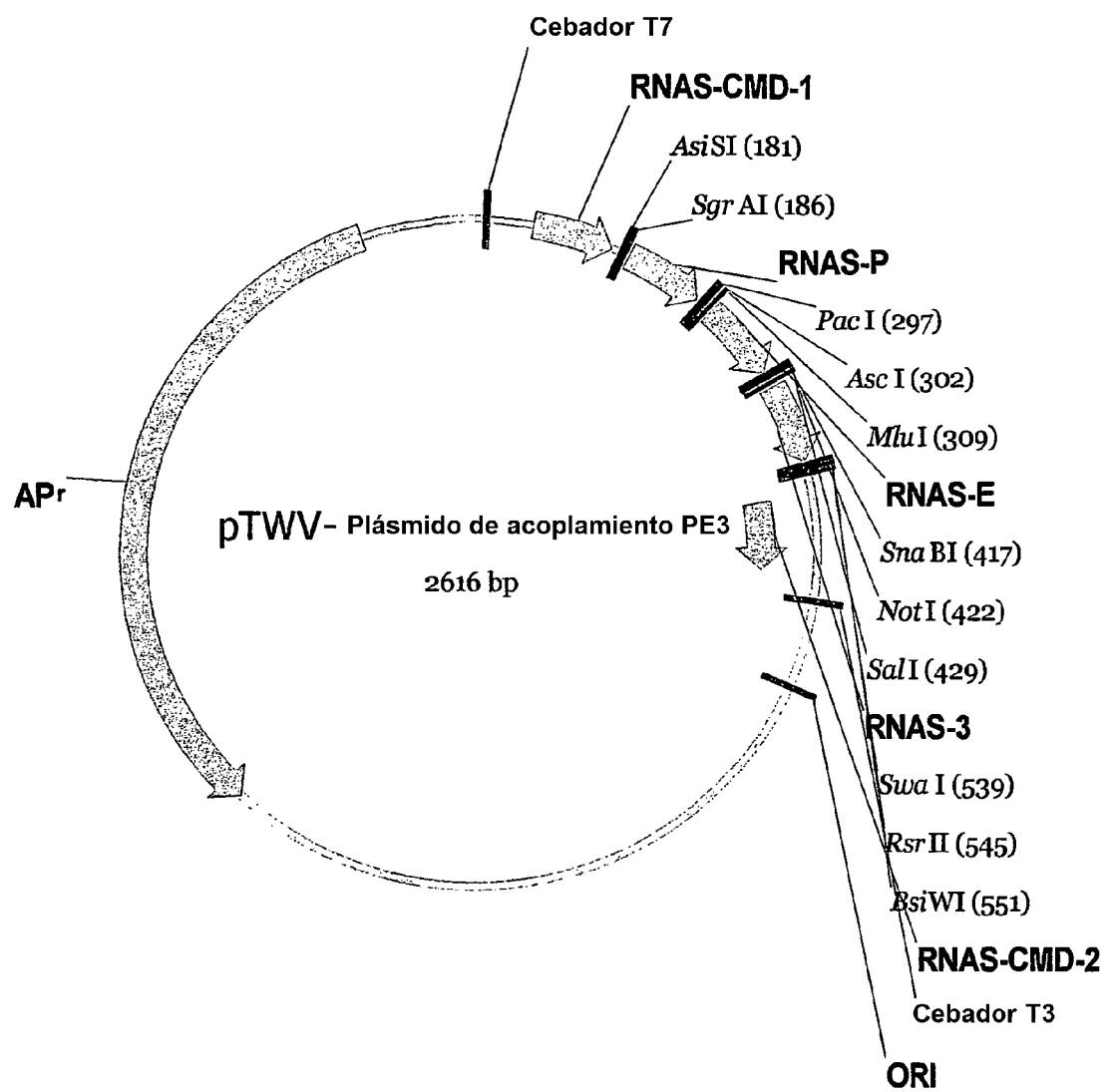


Figura 2

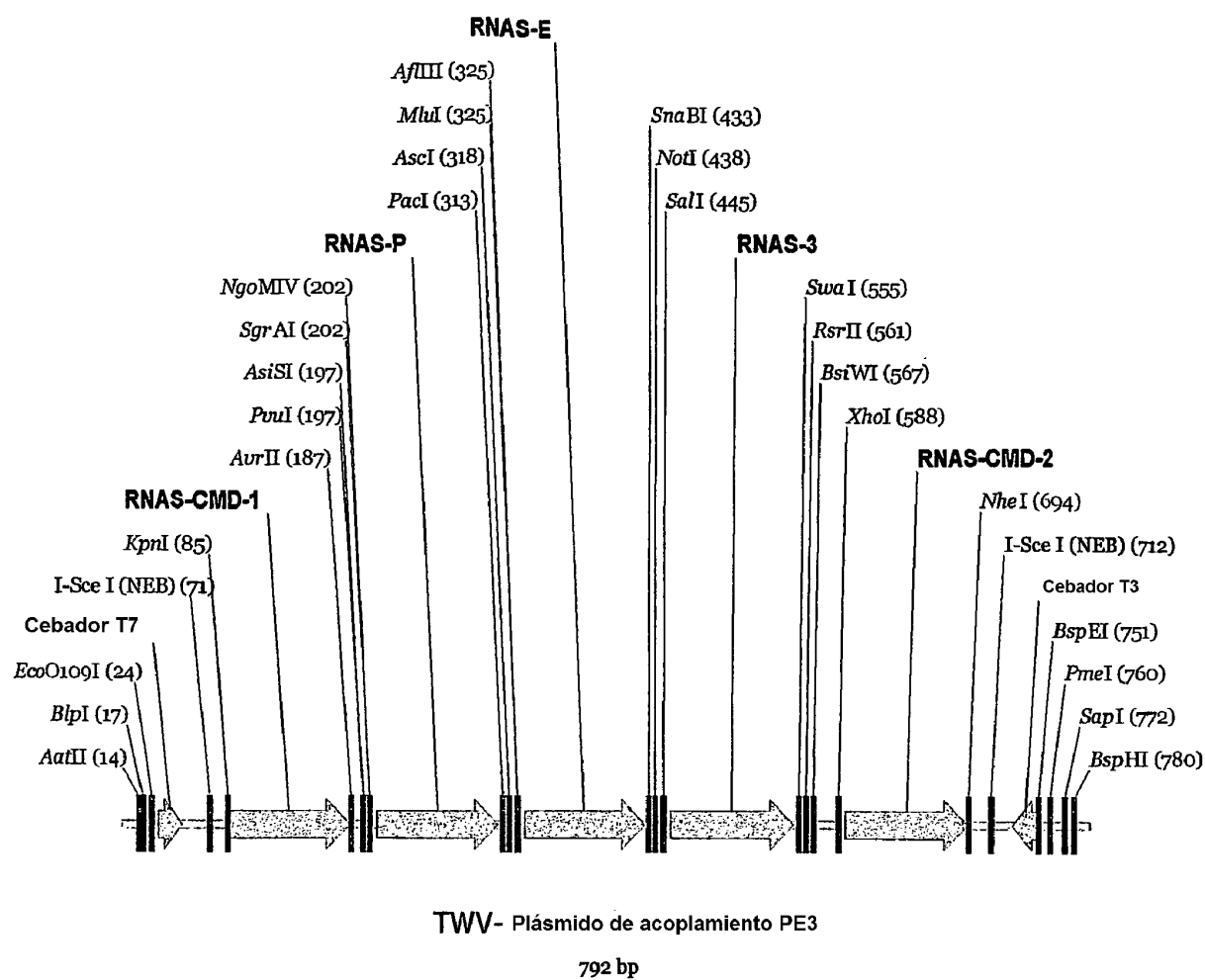


Figura 3

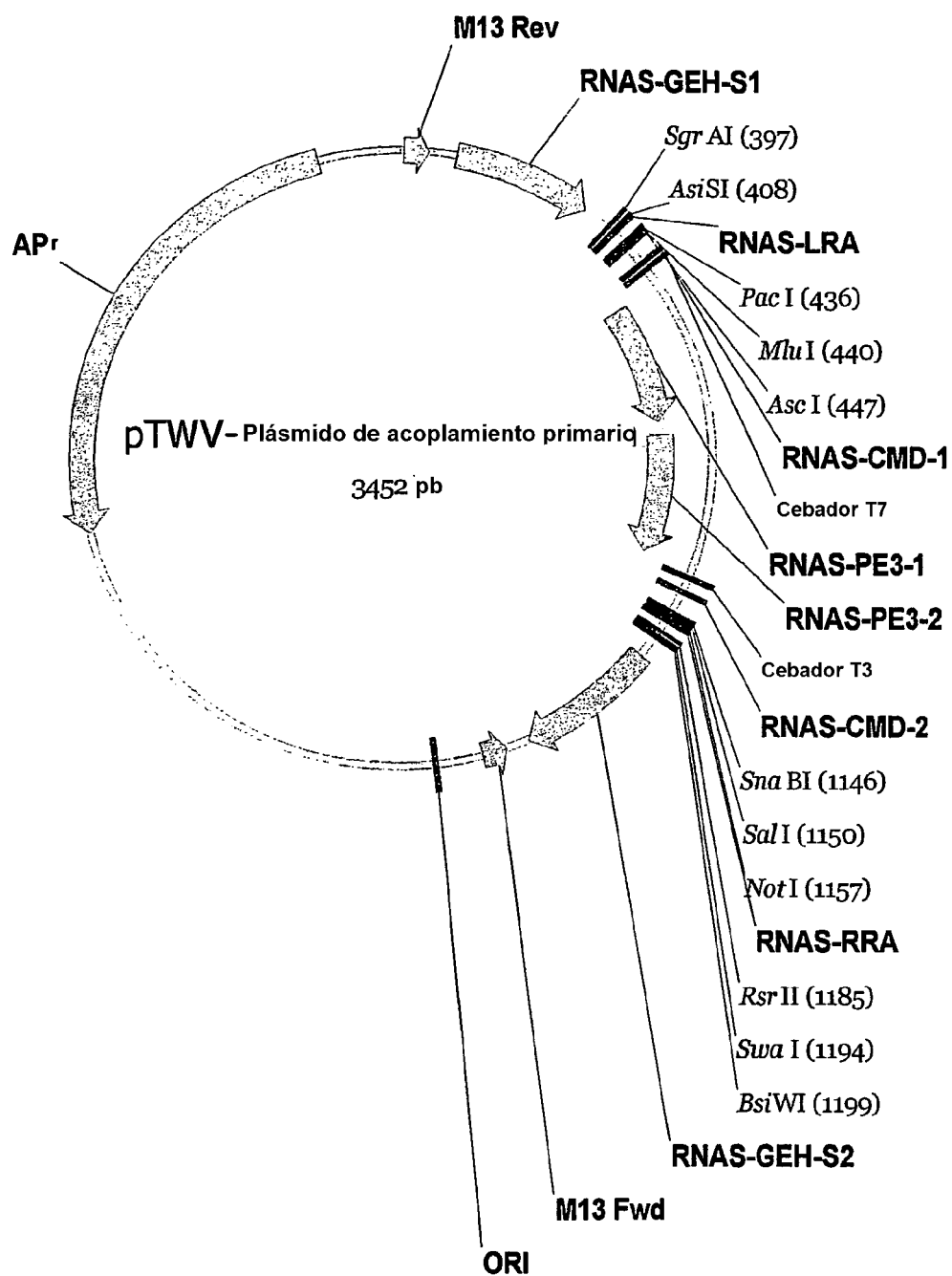


Figura 4

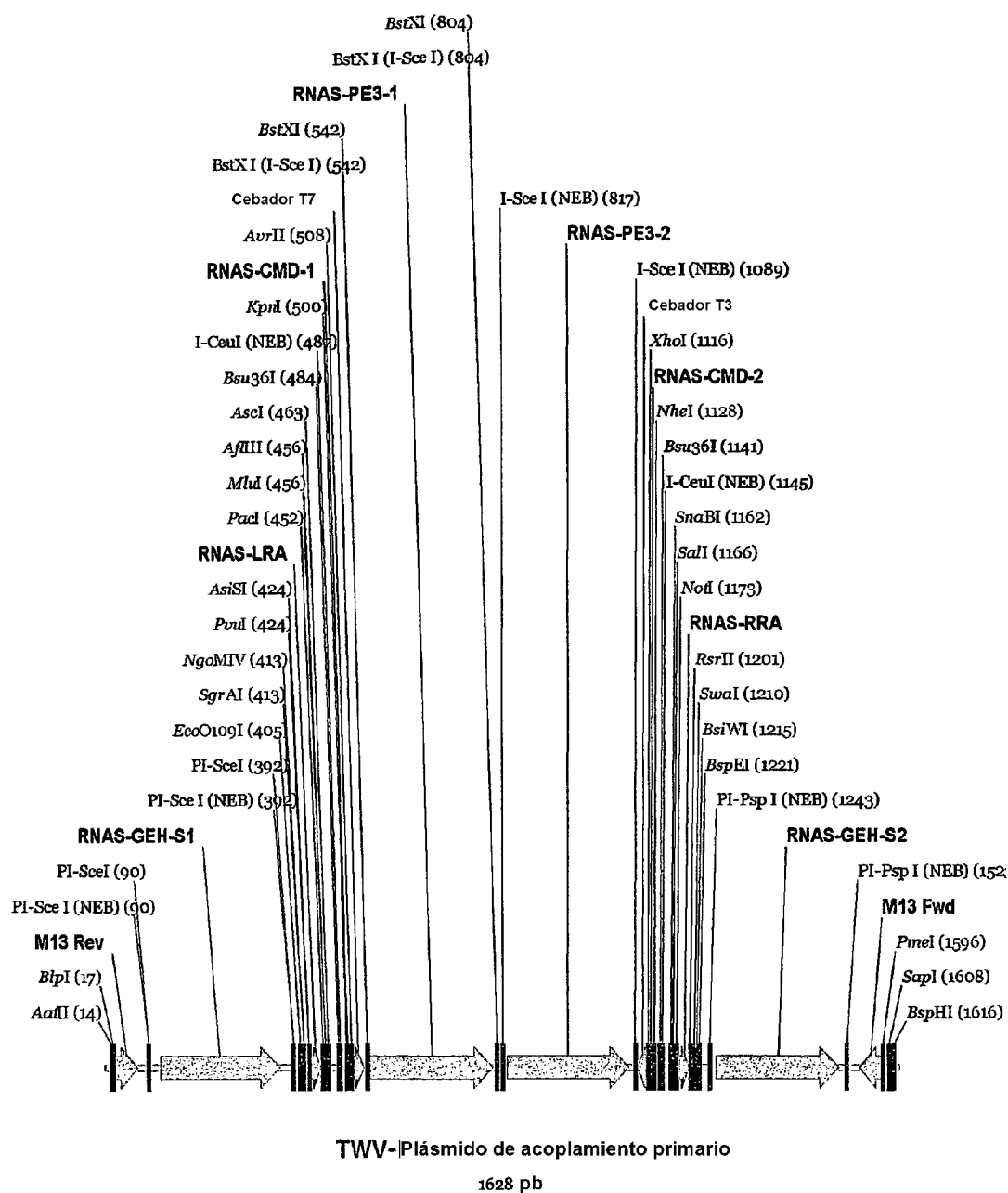


Figura 5

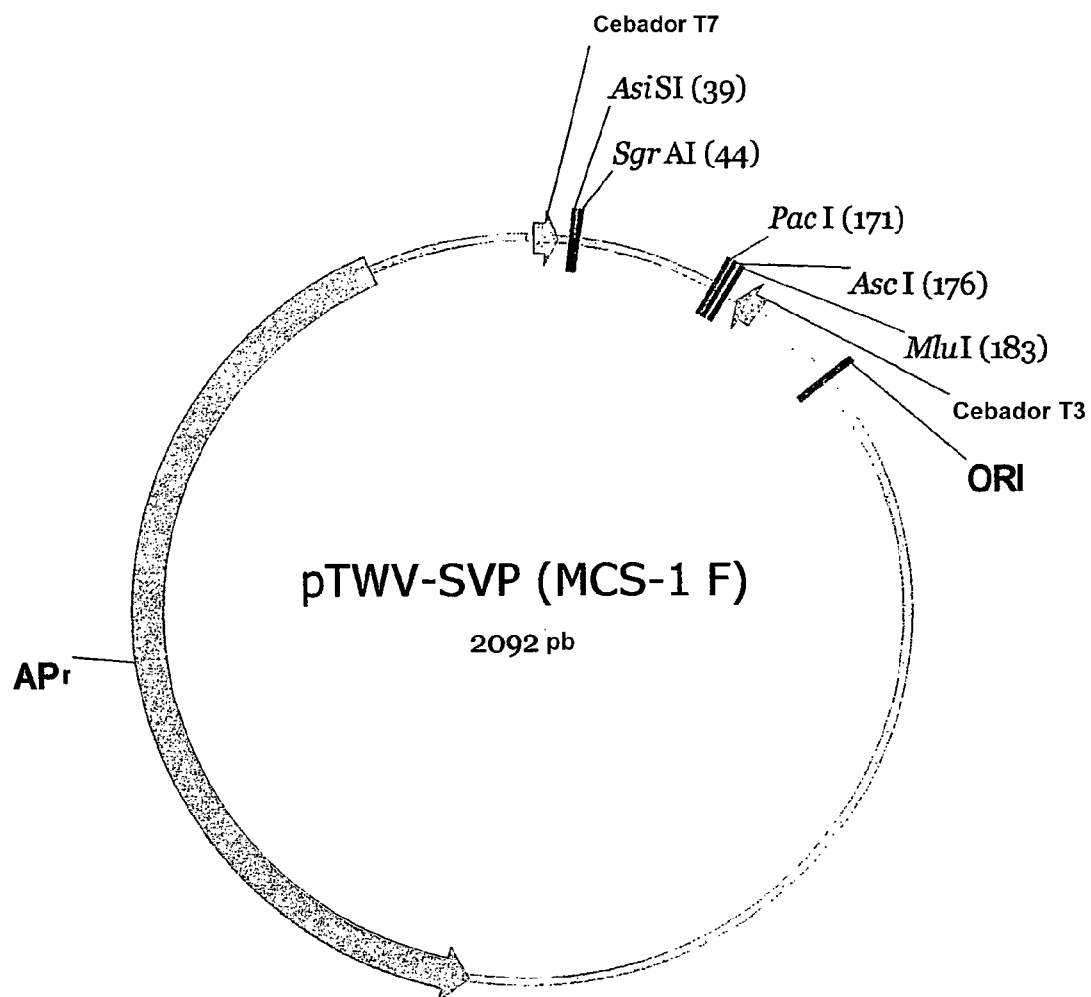


Figura 6

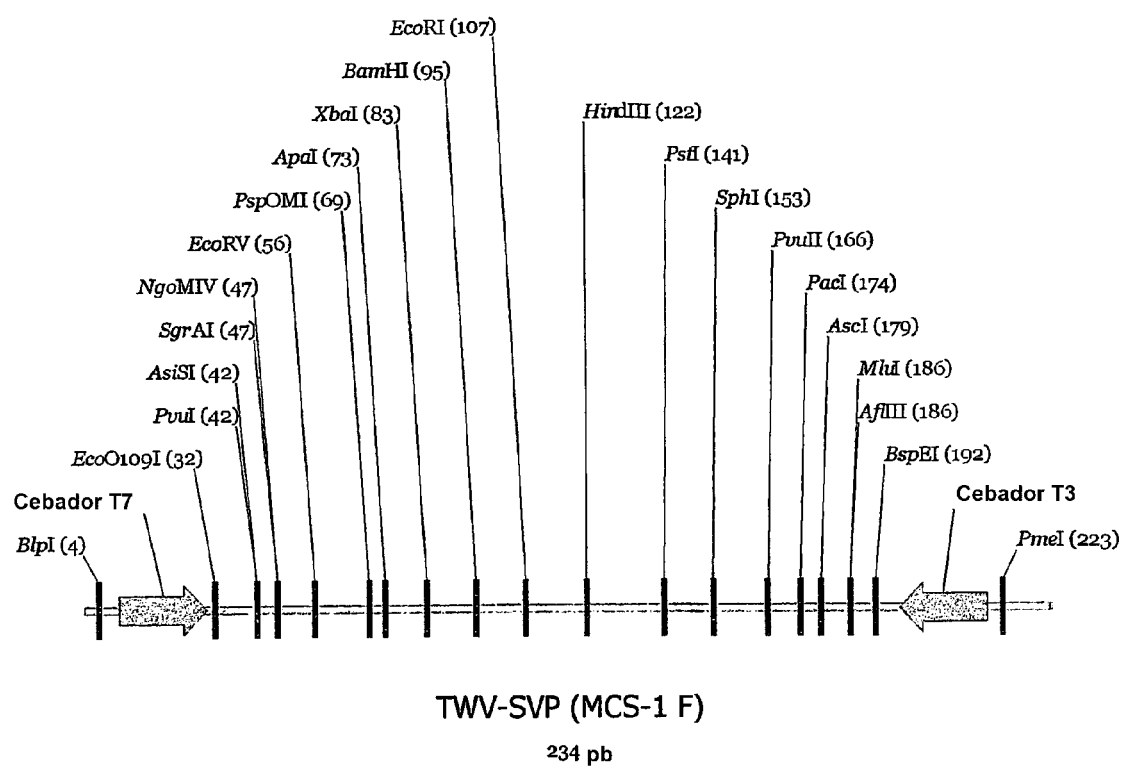


Figura 7

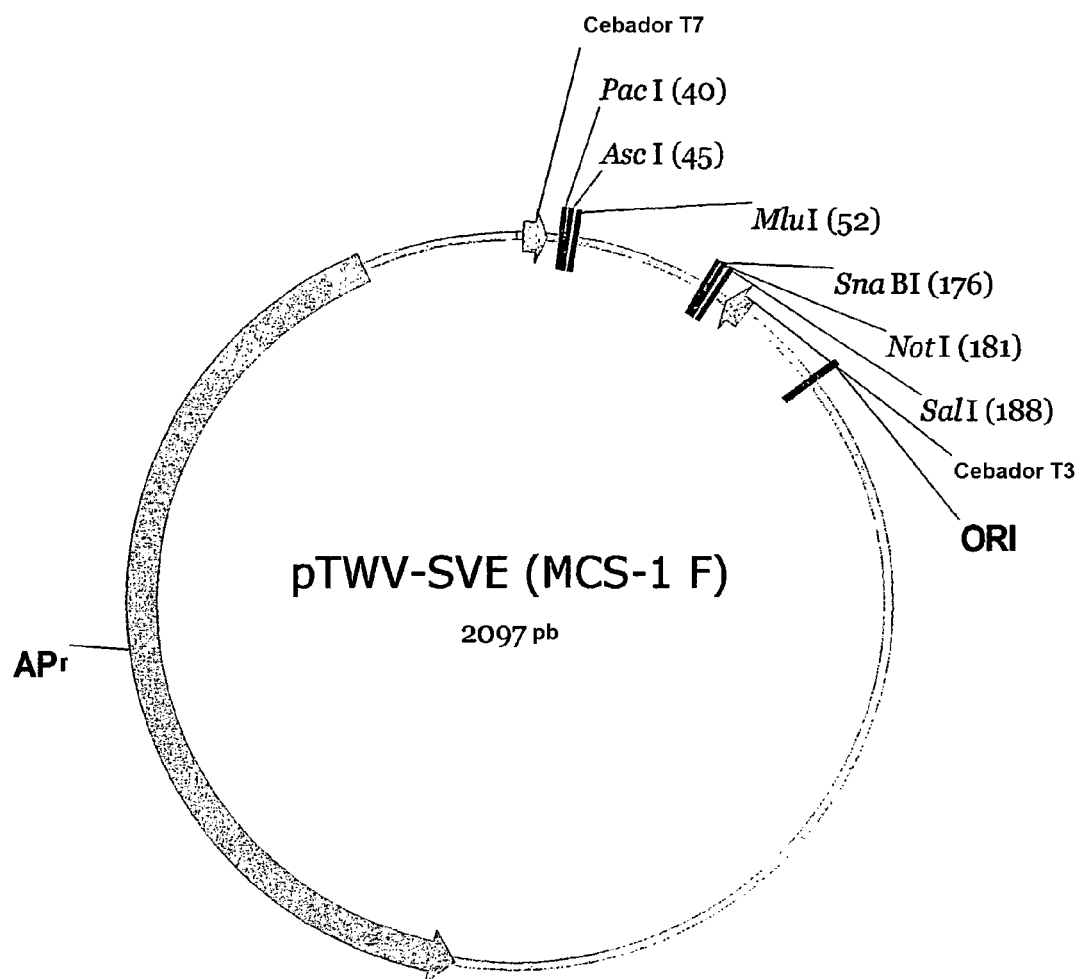


Figura 8

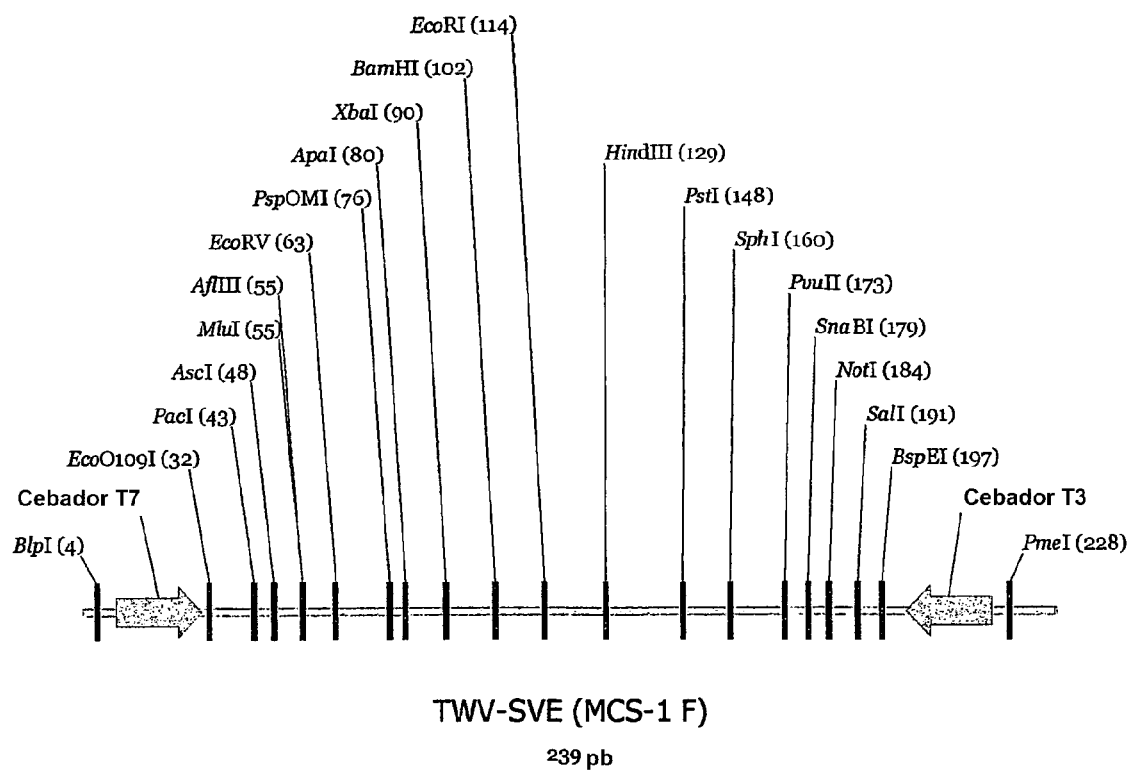


Figura 9

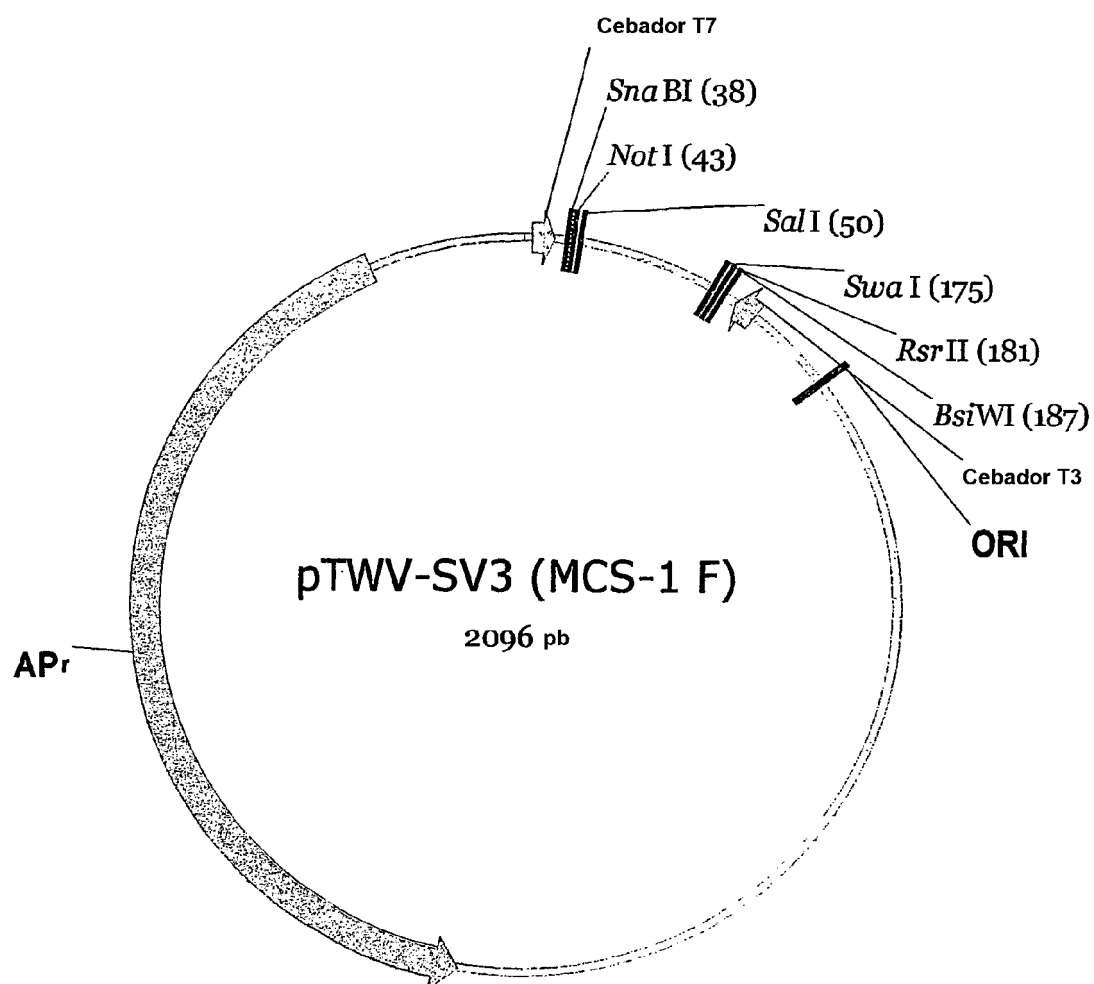


Figura 10

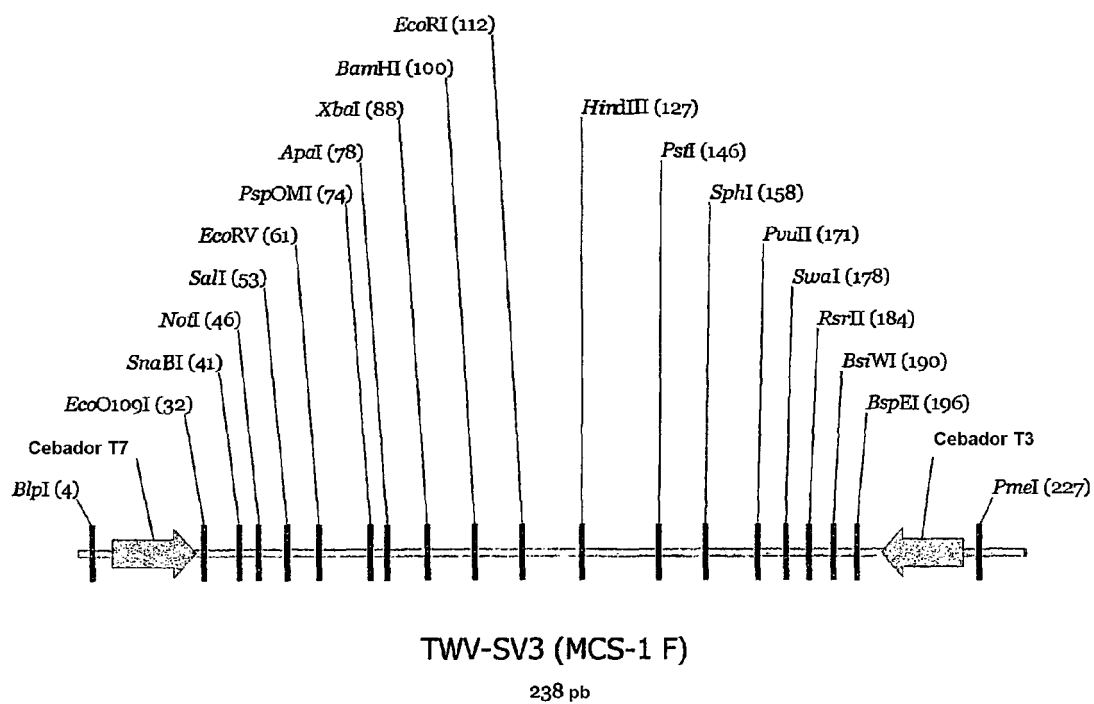


Figura 11

ES 2 346 219 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Genomatix, Ltd
 Genomatix, Ltd
 Reed, Thomas D.
 <120> Vectores plasmídicos de clonación de ADN y procedimientos para su uso
 <130> 60/417,282
 <150> 60/417,282
 10 <151> 2002-10-09
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.2
 15 <210> 1
 <211> 3452
 <212> ADN
 <213> Molécula de ADN sintética
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(347)
 25 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (411)..(430)
 30 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (530)..(779)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> mise_feature
 40 <222> (810)..(1059)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220> jjjj
 45 <221> misc_feature
 <222> (1163)..(1182)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1240)..(1489)
 <223> n es a, c, g, o t
 55 <400> 1
 tgagcagcggg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac tctgtagcat 60
 ctatgtcggg tgcggagaaa gaggtaatga aatggcannn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 240
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 300
 65 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntgc catttcatta 360
 cctcttttctc cgcacccgac atagataggg cctgcgccgg cggcgatcgc nnnnnnnnnn 420

ES 2 346 219 T3

	nnnnnnnnnn	ttaattaaac	gcgtggcgcg	cctaactata	acggtcctaa	ggtagcgagg	480
	taccgctggc	cctagggtaa	tacgactcac	tatagggcca	cataagtggg	nnnnnnnnnn	540
5	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
10	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	780
	cacttatgtg	gtagggataa	cagggtaatn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	840
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
15	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
20	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	ttacctgtt	atccctatcc	1080
	ctttagttag	ggtaattct	cgaggcagga	gctagctcgc	taccttagga	ccgttatagt	1140
	tatacgtagt	cgacgcggcc	gcnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nncgggccga	tttaaactgt	1200
25	acgtccggat	ggcaaacagc	tattatgggt	attatgggtg	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1260
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1320
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1380
30	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1440
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	cccataatac	1500
	ccataatagc	tgtttgccag	ctacagagtt	tactggccgt	cgttttacaa	cgtcgtgact	1560
35	gggaaaaccc	tggcggttta	aacgctcttc	cgcttccttc	atgtgagcaa	aaggccagca	1620
	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	1680
	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaacccga	caggactata	1740
40	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgacctgcc	1800
	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	1860
	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	1920
45	acccccggtt	cagcccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	1980
	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	2040
50	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	2100
	gacagtattt	ggtatctgcy	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	2160
	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcggtggt	ttttttgttt	gcaagcagca	2220
55	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	2280
	cgctcagtg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	atgataacta	tgactctctt	2340
	aaggtagcca	aattcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	2400
60	aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttgggtctga	cagttaccaa	2460

ES 2 346 219 T3

	tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagtgtgcc	2520
	tgactccccg tgggtgtagat aactacgata cgggaggggct taccatctgg cccagtgct	2580
5	gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca	2640
	gccggaaggg ccgagcgag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt	2700
	aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgtgggt	2760
10	gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc	2820
	ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc	2880
	tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt	2940
15	atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact	3000
	ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc	3060
20	ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt	3120
	ggaaagcggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg	3180
	atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct	3240
25	gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa	3300
	tgttgaaatac tcataactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt	3360
30	ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc	3420
	acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gc	3452

35	<210> 2
	<211> 792
	<212> ADN
	<213> molécula de ADN sintética
40	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (86)..(185)
	<223> n es a, c, g, o t
45	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (208)..(307)
50	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
	<221> mise_feature
	<222> (330)..(429)
55	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
	<221> misc_feature
60	<222> (451)..(550)
	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
	<221> misc_feature
65	<222> (593)..(692)
	<223> n es a, c, g o t

ES 2 346 219 T3

<400> 2

	gagagagaga cgtcgtgag caggccctgt aatacgactc actatagggg gcgccggagc	60
5	ttagggataa cagggtaatg gtaccnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	120
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	180
10	nnnnncctag ggcgatcgcc gccggcggnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	240
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	300
	nnnnnnntta attaaggcgc gccacgcgtn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	360
15	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	420
	nnnnnnnnnt acgtagcggc cgcgtcgacg nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	480
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	540
20	nnnnnnnnnn atttaaactcg gtccgcgtac gcatatagct aacagcctcg agnnnnnnnn	600
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	660
25	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngctagcat taccctgtta tccctagccg	720
	ctggcgcttc cctttagtga gggttaattt ccggagtta aacgctcttc cgcttccttc	780
	atgagagaga ga	792

30 <210> 3
 <211> 3452
 <212> ADN
 <213> molécula de ADN sintética
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(347)
 40 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (411)..(430)
 45 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (530)..(779)
 50 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (810)..(1059)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (1163)..(1182)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (1240)..(1489)
 <223> n es a, c, g, o t

ES 2 346 219 T3

<400> 3

	tgagcagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	tctgtagcat	60
5	ctatgtcggg	tgcgagaaaa	gaggtaaatga	aatggcannn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	120
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	180
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	240
10	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	300
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnntgc	catttcatta	360
	cctctttctc	cgaccccgac	atagataggc	cctgcgccgg	cggcgatcgc	nnnnnnnnnn	420
15	nnnnnnnnnn	ttaattaaac	gcgtggcgcg	cctaactata	acggtcctaa	ggtagcgagg	480
	taccgctggc	cctagggtaa	tacgactcac	tatagggccca	cataagtggg	nnnnnnnnnn	540
20	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
25	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	780
	cacttatgtg	gtagggataa	cagggtaatn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	840
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
30	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
35	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1080
	ctttagtgag	gggttaattct	cgaggcagga	gctagctcgc	taccttagga	ccgttatagt	1140
	tatacgtagt	cgacgcggcc	gcnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nncgggtccga	tttaaatacgt	1200
40	acgtccggat	ggcaaacagc	tattatgggt	attatgggtn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1260
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1320
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1380
45	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1440
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1500
	ccataatagc	tgtttgccag	ctacagagtt	tactggccgt	cgttttacaa	cgtcgtgact	1560
50	gggaaaaccc	tggcgggtta	aacgctcttc	cgcttccttc	atgtgagcaa	aaggccagca	1620
	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	1680
55	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccgga	caggactata	1740
	aagataaccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	1800
	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	1860
60	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	1920
	acccccggtt	cagccccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	1980
	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	2040
65	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	2100
	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	2160

ES 2 346 219 T3

	ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtggg ttttttgttt gcaagcagca	2220
	gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cgggggtctga	2280
5	cgctcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gattttgggtc atgataacta tgactctctt	2340
	aaggtagcca aattcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa	2400
	aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa ctgggtctga cagttaccaa	2460
10	tgcttaatatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcggttcac catagttgcc	2520
	tgactccccg tgggtgtagat aactacgata cgggaggggt taccatctgg cccagtgct	2580
	gcaatgatac cgcgagaccc acgttcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca	2640
15	gccggaaggg ccgagcgcag aagtgggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt	2700
	aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgtgggt	2760
	gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc	2820
20	ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc	2880
	tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt	2940
25	atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact	3000
	ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc	3060
	ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt	3120
30	ggaaagcggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg	3180
	atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct	3240
	gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa	3300
35	tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt	3360
	ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgc	3420
40	acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gc	3452

<210> 4

<211> 1628

<212> ADN

45 <213> molécula de ADN sintética

<220>

<221> misc_feature

50 <222> (114)..(363)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

55 <222> (427)..(446)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

60 <222> (546)..(795)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

65 <221> misc_feature

<222> (826)..(1075)

ES 2 346 219 T3

<223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1179)..(1198)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1256)..(1505)
 <223> n es a, c, g, o t
 15 <400> 4
 gagagagaga cgctcgctgag cagcgggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 60
 gattactctg tagcatctat gtcgggtgcg gagaaagagg taatgaaatg gcannnnnnnn 120
 20 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 180
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 240
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 300
 25 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 360
 nnnngccatt tcattacctc tttctccgca cccgacatag ataggccctg cgccggcgggc 420
 gatcgcnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnntaa ttaaacgcgt ggcgcgcccta actataacgg 480
 30 tcctaaggta gcgaggtagc gctggcccta gggtaatagc actcactata gggccacata 540
 agtggnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 600
 35 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 660
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 720
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 780
 40 nnnnnnnnnnn nnnnnccact tatgtggtag ggataacagg gtaatnnnnn nnnnnnnnnnn 840
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 900
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 960
 45 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1020
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnattac 1080
 50 cctgttatcc ctatcccttt agtgagggtt aattctcgag gcaggagcta gctcgctacc 1140
 ttaggaccgt tatagttata cgtagtcgac gcggccgcnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnncg 1200
 gtccgattta aatcgtagct ccggatggca aacagctatt atgggtatta tgggtnnnnn 1260
 55 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1320
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1380
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1440
 60 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1500
 nnnnnnaccca taatacccat aatagctggt tgccagctac agagtttact ggccgtcggt 1560
 65 ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc ggtttaaacg ctcttccgct tccttcatga 1620
 gagagaga 1628

ES 2 346 219 T3

<210> 5

<211> 2092

<212> ADN

5 <213> molécula de ADN sintética

<400> 5

10	tgagcgtaat acgactcact atagggaggc cctgcgatcg ccgccggcgg atatcggagc	60
	tgctgggccc agggagcttc tagaggagct ggatccgctg gagaattcgg agctggaaag	120
	cttggagctg ctctgcaggg agctgcatgc gctggcgcac agctgttaat taaggcgcg	180
15	cacgcgttcc ggattccctt tagtgagggt taattgttta aacgctcttc cgcttccttc	240
	atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt	300
	ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg	360
20	cgaaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	420
	tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctctcc ttcgggaagc	480
25	gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgcttcgctcc	540
	aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	600
	tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	660
30	aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct	720
	aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	780
35	ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt	840
	ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	900
	atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc	960
40	atgataacta tgactctctt aaggtagcca aattcatgag attatcaaaa aggatcttca	1020
	cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa	1080
	cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	1140
45	ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tgggtgtagat aactacgata cgggagggct	1200
	taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt	1260
50	tatcagcaat aaaccagcca gccggaagg cagagcgagc aagtggctct gcaactttat	1320
	ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	1380
	atagtttgcg caacgtgggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	1440
55	gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	1500
	tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	1560
60	cagtgttatc actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg	1620
	taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	1680
	ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa	1740

65

ES 2 346 219 T3

5 **ctttaaaagt gctcatcatt ggaaagcggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac 1800**
 cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt 1860
 ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 1920
 gaataagggc gacacggaaa tggtgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa 1980
 10 **gcatttatca gggttattgt ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 2040**
 aacaaatagg ggttcgcgc acatttccc gaaaagtgcc acctgacgtc gc 2092

15 <210> 6
 <211> 234
 <212> ADN
 20 <213> molécula de ADN sintética
 <400> 6

25 **cgctgagcgt aatacgactc actataggga ggccctgcga tcgccgccgg cggatatcgg 60**
 30 **agctgctggg cccagggagc ttctagagga gctggatccg ctggagaatt cggagctgga 120**
 aagcttgag ctgctctgca gggagctgca tgcgctggcg cacagctgtt aattaaggcg 180
 cgccacgcgt tccggattcc ctttagtgag ggttaattgt ttaaacgctc ttcc 234

40 <210> 7
 <211> 2097
 <212> ADN
 <213> molécula de ADN sintética

45

50

55

60

65

ES 2 346 219 T3

<400> 7

5	tgagcgtaat acgactcact atagggaggg cctgttaatt aaggcgcgcc acgcggtgata	60
	tccggagctgc tgggcccagg gagcttctag aggagctgga tccgctggag aattcggagc	120
	tggaaagctt ggagctgctc tgcagggagc tgcattgcgt ggcgcacagc tgtacgtagc	180
10	ggccgcgtcg actccggatt cccttttagtg aggggttaatt gtttaaacgc tcttccgctt	240
	cccttcatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg	300
	cgtttttcca taggctccgc ccccttgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	360
15	ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg	420
	tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg	480
	gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc	540
20	gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	600
	gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	660
25	ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg	720
	ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag	780
	ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	840
30	gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc	900
	ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt	960
	tggtcatgat aactatgact ctcttaagggt agccaaattc atgagattat caaaaaggat	1020
35	cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	1080
	gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg	1140
40	tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccggtgtg tagataacta cgatacggga	1200
	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc	1260
	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgagaaagt gtcctgcaac	1320
45	tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	1380
	agttaatagt ttgcgcaacg tggttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	1440
	gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	1500
50	catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctccg atcgttgtca gaagtaagtt	1560
	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	1620
	atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg	1680
55	tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	1740
	cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa gcgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat	1800
60	cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc	1860
	atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa	1920
	aaagggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta	1980
65	ttgaagcatt tatcaggggt attgtctcat gcgcggatac atatttgaat gtatttagaa	2040
	aaataaacia ataggggttc cgcgacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtcgc	2097

ES 2 346 219 T3

<210> 8

<211> 239

<212> ADN

5 <213> molécula de ADN sintética

<400> 8

10
cgctgagcgt aatacgactc actataggga ggccctgtta attaaggcgc gccacgcgtg 60
atatcggagc tgctgggccc agggagcttc tagaggagct ggatccgctg gagaattcgg 120
15 **agctggaaag cttggagctg ctctgcaggg agctgcatgc gctggcgcac agctgtacgt 180**
agcggccgcg tcgactccgg attcccttta gtgagggtta attgtttaaa cgctcttcc 239

20

<210> 9

<211> 2096

25 <212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

<400> 9

30
tgagcgtaat acgactcact atagggaggc cctgtacgta gcggccgcgt cgacgatatc 60
ggagctgctg ggcccaggga gcttctagag gagctggatc cgctggagaa ttcggagctg 120
35 **gaaagcttgg agctgctctg cagggagctg catgcgctgg cgcacagctg atttaaactg 180**
gtccgcgtac gtccggattc cctttagtga gggttaattg tttaaacgct cttccgcttc 240
40 **cttcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 300**

45

50

55

60

65

ES 2 346 219 T3

	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtcagag	360
	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	420
5	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	480
	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcgttcg	540
10	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cggttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	600
	taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	660
	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatatgt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	720
15	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	at ttgggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	780
	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	840
	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	900
20	tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt	aagggtatttt	960
	ggtcattgata	actatgactc	tcttaaggta	gccaaattca	tgagattatc	aaaaaggatc	1020
25	ttcacctaga	tcctttttaaa	ttaaaaatga	agtttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	1080
	taaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtggag	cacctatctc	agcgatctgt	1140
	ctatttcggt	catccatagt	tgccctgactc	cccgtgggtg	agataactac	gatacgggag	1200
30	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	accacgctc	accggctcca	1260
	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	1320
35	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	1380
	gttaatagtt	tgcgcaacgt	ggttgccatt	gctacaggca	tcgtgggtgc	acgctcgctg	1440
	tttggtatgg	cttcattcag	ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	1500
40	atgtttgtgca	aaaaagcgg	tagctccttc	ggtcctccga	tcgtttgtcag	aagtaagttg	1560
	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	gactgcata	attctcttac	tgtcatgccca	1620
	tccgtaagat	gcttttctgt	gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtgt	1680
45	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	1740
	agaactttta	aagtgtcat	cattggaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	1800
50	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcggtg	cacccaactg	atcttcagca	1860
	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	1920
	aagggaataa	gggcgacacg	gaaatgttga	atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	1980
55	tgaagcattt	atcaggggtta	ttgtctcatg	cgcggatata	tatttgaaatg	tatttagaaa	2040
	aataaaca	taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	tgccacctga	cgtcgc	2096

60

<210> 10

<211> 238

<212> ADN

65

<213> molécula de ADN sintética

ES 2 346 219 T3

<400> 10

5	cgctgagcgt aatacgactc actatagggg ggcctgtac gtagcggccg cgtcgacgat	60
10	atcggagctg ctgggcccag ggagcttcta gaggagctgg atccgctgga gaattcggag ctggaaagct tggagctgct ctgcagggag ctgcatgcmc tggcgcacag ctgatttaaa	120 180
15	tcggtccgcg tacgtccgga ttccctttag tgagggttaa ttgtttaaac gctcttcc	238

20 LISTADO DE SECUENCIAS

25	<110> Intrexon Corporation <120> Vectores plasmídicos de clonación de ADN y procedimientos para su uso <130> 28569-508-EP1 <140> EP 04751078.9 <141> 04/05/2004 <150> 10/682,764 <151> 2003-10-09 <160> 10 <170> PatentIn versión 3.3 <210> 1 <211> 3452 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Constructo sintético <220> <221> misc_feature <222> (98)..(347) <223> "n" es a, c, g, o t <220> <221> misc_feature <222> (411)..(430) <223> "n" es a, c, g o t <220> <221> misc_feature <222> (530)..(779) <223> "n" es a, c, g o t <220> <221> misc_feature <222> (810)..(1059) <223> "n" es a, c, g o t <220>	35 40 45 50 55 60 65
----	--	--

ES 2 346 219 T3

<221> misc_feature
 <222> (1163)..(1182)
 <223> "n" es a, c, g o t
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1240)..(1489)
 10 <223> "n" es a, c, g o t
 <400> 1

15	tgagcagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac tctgtagcat	60
	ctatgtcggg tgcggagaaa gaggtaatga aatggcannn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	120
20	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	180
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	240
25	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	300
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntgc catttcatta	360
	cctctttctc cgcacccgac atagataggc cctgcgccgg cggcgatcgc nnnnnnnnnn	420
30	nnnnnnnnnn ttaattaaac gcgtggcgcg cctaactata acggtcctaa ggtagcgagg	480
	taccgctggc cctagggtaa tacgactcac tatagggcca cataagtggg nnnnnnnnnn	540

ES 2 346 219 T3

	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
5	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	780
	cacttatgtg	gtagggataa	cagggtaatn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	840
10	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
15	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	ttaccctggt	atccctatcc	1080
	cttttagtgag	ggttaattct	cgaggcagga	gctagctcgc	taccttagga	ccgttatagt	1140
	tatacgtagt	cgacgcggcc	gcnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nncgggtccga	tttaaatacgt	1200
20	acgtccgat	ggcaaacagc	tattatgggt	attatgggt	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1260
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1320
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1380
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1440
25	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	cccataatac	1500
	ccataatagc	tgtttgccag	ctacagagtt	tactggccgt	cgttttacaa	cgtcgtgact	1560
	gggaaaacc	tggcggttta	aacgctcttc	cgcttccttc	atgtgagcaa	aaggccagca	1620
30	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	1680
	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccgga	caggactata	1740
	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	1800
35	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	1860
	acgctgtagg	tatctcagtt	gggtgtaggt	cgttcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	1920
	acccccgtt	cagcccagcc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaacc	1980
40	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	2040
	gtatgtaggc	gggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	2100
	gacagtat	gggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	2160
45	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcgggtgg	ttttttgttt	gcaagcagca	2220
	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	2280
	cgctcagtg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttgggt	atgataacta	tgactctctt	2340
50	aaggtagcca	aattcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	2400
	aaatgaagtt	ttaaatacat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	2460
	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	catagttgcc	2520
	tgactccccg	tgggttagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgct	2580
55	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	2640
	gccggaaggg	ccgagcgag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	2700
	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	caacgtgggt	2760
60	gccattgcta	caggcatcgt	gggtgcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	2820

65

ES 2 346 219 T3

gggtcccaac gatcaaggcg agtñacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc 2880
 tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt 2940
 5 atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 3000
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 3060
 10 ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 3120
 ggaaagcgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 3180
 atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 3240
 15 gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 3300
 tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 3360
 20 ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 3420
 acatttcccc qaaaaqtqcc acctqacqtc qc 3452

25

<210> 2

<211> 792

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCS del plásmido de acoplamiento PE3

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (86)..(185)

<223> “n” es a, c, g o t

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (208)..(307)

45

<223> “n” es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (330)..(429)

50

<223> “n” es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (451)..(550)

55

<223> “n” es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

60

<222> (593)..(692)

<223> “n” es a, c, g o t

65

ES 2 346 219 T3

<400> 2

5	gagagagaga cgtcgctgag caggccctgt aatacgactc actatagggg gcgccggagc	60
	ttagggataa cagggtaatg gtaccnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	120
10	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	180
	nnnnncctag ggcgatcgcc gccggcggnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	240
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	300
15	nnnnnnntta attaaggcgc gccacgcgtn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	360
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	420
	nnnnnnnnnt acgtagcggc cgcgtcgacg nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	480
20	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	540
	nnnnnnnnnn atttaaactg gtccgcgtac gcatatagct aacagcctcg agnnnnnnnn	600
25	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	660
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngctagcat taccctgtta tccctagccg	720
	ctggcgcttc ccttttagtga gggttaattt ccggagttta aacgctcttc cgcttccttc	780
30	atgagagaga ga	792

35	<210> 3
	<211> 3452
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> Plásmido de acoplamiento primario
	<220>
45	<221> misc_feature
	<222> (98)..(347)
	<223> “n” es a, c, g o t
50	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (411)..(430)
	<223> “n” es a, c, g o t
55	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (530)..(779)
60	<223> “n” es a, c, g o t
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (810)..(1059)
65	<223> “n” es a, c, g o t
	<220>

ES 2 346 219 T3

<221> misc_feature

<222> (1163)..(1182)

5 <223> "n" es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1240)..(1489)

10 <223> "n" es a, c, g o t

<400> 3

15

tgagcagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac tctgtagcat 60

ctatgtcggg tgcggagaaa gaggtaatga aatggcannn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

20

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 240

25

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 300

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntgc catttcatta 360

cctctttctc cgcacccgac atagataggc cctgcgccgg cggcgatcgc nnnnnnnnnn 420

30

nnnnnnnnnn ttaattaaac gcgtggcgcg cctaactata acggtcctaa ggtagcgagg 480

taccgctggc ctagggtaa tacgactcac tatagggcca cataagtggc nnnnnnnnnn 540

35

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 600

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 660

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 720

40

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnnc 780

45

50

55

60

65

ES 2 346 219 T3

	cacttatgtg gtagggataa cagggtaatn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	840
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	900
5	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	960
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1020
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnna ttaccctgtt atccctatcc	1080
10	cttttagtgag ggtaattct cgaggcagga gctagctcgc taccttagga ccgttatagt	1140
	tatacgtagt cgacgcggcc gcnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncgggtccga tttaaactcg	1200
	acgtccggat ggcaaacagc tattatgggt attatgggtt nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1260
15	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1320
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1380
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1440
20	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnna cccataatac	1500
	ccataatagc tgtttgccag ctacagagtt tactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact	1560
	gggaaaaccc tggcgggttta aacgctcttc cgcttccttc atgtgagcaa aaggccagca	1620
25	aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccatagga tccgcccccc	1680
	tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata	1740
	aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	1800
30	gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	1860
	acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgctcgtccc aagctgggct gtgtgcacga	1920
	acccccggtt cagcccagac gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	1980
35	ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	2040
	gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag	2100
	gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	2160
40	ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgtt ttttttgtt gcaagcagca	2220
	gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	2280
	cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggct atgataacta tgactctctt	2340
45	aaggtagcca aattcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa	2400
	aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa	2460
	tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcggtcatc catagttgcc	2520
50	tgactccccg tgggtgtagat aactacgata cgggagggtt taccatctgg cccagtgct	2580
	gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca	2640
	gccggaaggg ccgagcgagc aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt	2700
55	aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgtgggt	2760
	gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcggttg gtatggcttc attcagctcc	2820
	ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggtagc	2880
60	tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt	2940
	atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact	3000
	ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc	3060

65

ES 2 346 219 T3

	ccggcgctcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt	3120
	ggaaaagcggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg	3180
5	atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct	3240
	gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa	3300
10	tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt	3360
	ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc	3420
	acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gc	3452

15

	<210> 4	
20	<211> 1628	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> MCS de plásmido de acoplamiento primario	
	<220>	
	<221> misc_feature	
30	<222> (114)..(363)	
	<223> "n" es a, c, g o t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (427)..(446)	
	<223> "n" es a, c, g o t	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (546)..(795)	
	<223> "n" es a, c, g o t	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (826)..(1075)	
	<223> "n" es a, c, g o t	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (1179)..(1198)	
	<223> "n" es a, c, g o t	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1256)..(1505)	
60	<223> "n" es a, c, g o t	

65

ES 2 346 219 T3

<400> 4

5	gagagagaga	cgtcgctgag	cagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	60
	gattactctg	tagcatctat	gtcgggtgcg	gagaaagagg	taatgaaatg	gcannnnnnn	120
10	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	180
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	240
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	300
15	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	360
	nnntgccatt	tcattacctc	tttctccgca	cccgcacatag	ataggccctg	cgccggcggc	420
20	gatcgcnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnntta	ttaaacgcgt	ggcgcgccta	actataacgg	480
	tcctaaggta	gcgaggtacc	gctggcccta	gggtaatacg	actcactata	gggccacata	540
	agtggnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
25	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
30	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	780
	nnnnnnnnnn	nnnnnccact	tatgtggtag	ggataacagg	gtaatnnnnn	nnnnnnnnnn	840
35	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
40	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnattac	1080
	cctgttatcc	ctatcccttt	agtgagggtt	aattctcgag	gcaggagcta	gctcgctacc	1140
45	ttaggaccgt	tatagttata	cgtagtcgac	gcggccgcnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnncg	1200
	gtccgattta	aatcgtacgt	ccggatggca	aacagctatt	atgggtatta	tgggtnnnnn	1260
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1320
50	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1380
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1440
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1500
55	nnnnnaccca	taatacccat	aatagctggt	tgccagctac	agagtttact	ggccgtcggt	1560
	ttacaacgct	gtgactggga	aaaccctggc	ggtttaaacg	ctcttccgct	tccttcatga	1620
60	gagagaga						1628

65 <210> 5
 <211> 2092
 <212> ADN

ES 2 346 219 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido SVP

5

<400> 5

10	tgagcgtaat acgactcact atagggaggc cctgcgatcg ccgccggcgg atatcggagc	60
	tgctgggccc agggagcttc tagaggagct ggatccgctg gagaattcgg agctggaaag	120
	cttgagagctg ctctgcaggg agctgcatgc gctggcgcac agctgttaat taaggcgcg	180
15	cacgcgttcc ggattccctt tagtgagggt taattgttta aacgctcttc cgcttccttc	240
	atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcgctt	300
20	ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	360
	cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	420
	tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc	480
25	gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc	540
	aagctgggct gtgtgcacga accccccggt cagcccagacc gctgcgcctt atccggtaac	600
30	tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	660
	aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct	720
	aactacggct acactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	780
35	ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt	840
	ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	900

40

45

50

55

60

65

ES 2 346 219 T3

	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtg	aacgaaaact	cacgttaagg	gatttttggtc	960
	atgataacta	tgactctctt	aaggtagcca	aattcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	1020
5	cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	1080
	cttgggtctga	cagttaccaa	tgcttaata	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	1140
10	ttcgttcac	catagttgcc	tgactccccg	tggtgtagat	aactacgata	cgggagggct	1200
	taccatctgg	ccccagtgt	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	1260
	tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtgggtcct	gcaactttat	1320
15	ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	1380
	atagtttgcg	caacgtgggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	1440
20	gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	1500
	tgtgcaaaaa	agcgggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	1560
	cagtgttatc	actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	1620
25	taagatgctt	ttctgtgact	gggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	1680
	ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgctca	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	1740
30	ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaagcggt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	1800
	cgctgttgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	1860
	ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	1920
35	gaataagggc	gacacggaaa	tggtgaatac	tcataactctt	cctttttcaa	tattattgaa	1980
	gcatttatca	gggttattgt	ctcatgcgcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	2040
40	aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	gc	2092

<210> 6

<211> 234

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCS del plásmido SVP

50 <400> 6

	cgctgagcgt	aatacgactc	actataggga	ggccctgcga	tcgccgccgg	cggatatcgg	60
55	agctgctggg	cccaggggagc	ttctagagga	gctggatccg	ctggagaatt	cggagctgga	120
	aagcttgag	ctgctctgca	gggagctgca	tcgctggcg	cacagctgtt	aattaaggcg	180
	cgccacgcgt	tccggattcc	ctttagttag	gggttaattgt	ttaaacgctc	ttcc	234

60 <210> 7

<211> 2097

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 346 219 T3

<223> Plásmido SVE

<400> 7

5	tgagcgtaat acgactcact atagggagggc cctgttaatt aaggcgcgcc acgcgtgata	60
	tcggagctgc tgggcccagg gagcttctag aggagctgga tccgctggag aattcggagc	120
	tggaaagctt ggagctgctc tgcagggagc tgcctgcgct ggcgcacagc tgtacgtagc	180
10	ggccgcgtcg actccggatt ccctttagtg aggggttaatt gtttaaacgc tcttccgctt	240
	ccctcatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg	300
15	cgtttttcca taggctccgc ccccttgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	360
	ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg	420
	tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg	480
20	gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc	540
	gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	600
	gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	660
25	ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtgg	720
	ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag	780
	ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	840
30	gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc	900
	ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt	960
35	tggtcatgat aactatgact ctcttaaggt agccaaattc atgagattat caaaaaggat	1020
	cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	1080
	gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg	1140
40	tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccggtgtg tagataacta cgatacggga	1200
	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggctcc	1260
	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac	1320
45	tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	1380
	agttaatagt ttgcgcaacg tggttgcat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	1440
	gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	1500
50	catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt	1560
	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	1620
	atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg	1680
55	tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	1740
	cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa gcgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat	1800
	cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc	1860
60	atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa	1920
	aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta	1980
65	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gcgcggatac atatttgaat gtatttagaa	2040
	aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtcgc	2097

ES 2 346 219 T3

<210> 8
 <211> 239
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MCS del plásmido SVE
 10 <400> 8

15 **cgctgagcgt aatacgactc actataggga ggcctgttta attaaggcgc gccacgcgtg 60**
 atatcggagc tgctgggccc agggagcttc tagaggagct ggatccgctg gagaattcgg 120
 20 **agctggaaag cttggagctg ctctgcaggg agctgcatgc gctggcgcac agctgtacgt 180**
 agcggccgcg tcgactccgg attcccttta gtgagggtta attgtttaaa cgctcttcc 239

25
 <210> 9
 <211> 2096
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Plásmido SV3

40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 346 219 T3

<400> 9

5	tgagcgtaat acgactcact atagggaggc cctgtacgta gcggccgcgt cgacgatatc	60
	ggagctgctg ggcccagggg gcttctagag gagctggatc cgctggagaa ttcggagctg	120
	gaaagcttgg agctgctctg cagggagctg catgcgctgg cgacagctg atttaaactc	180
10	gtccgcgtac gtccggattc ccttttagtga gggtaattg tttaaactgct cttccgcttc	240
	cttcattgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc	300
	gtttttccat aggtccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag	360
15	gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt	420
	gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg	480
	aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggtcg	540
20	ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ctttatccgg	600
	taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac	660
25	tggttaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt	720
	gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt	780
	taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg	840
30	tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	900
	tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggaattt	960
	ggtcattgata actatgactc tcttaaggta gccaaattca tgagattatc aaaaaggatc	1020
35	ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaag tatatatgag	1080
	taaacttgggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt	1140
40	ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtggtgt agataactac gatacgggag	1200
	ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca	1260
	gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact	1320
45	ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca	1380
	gttaatagtt tgcgcaacgt ggttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg	1440
	tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc	1500
50	atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg	1560
	gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcc	1620
55	tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt	1680
	atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc	1740
	agaactttaa aagtgtcat cattggaaag cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc	1800
60	ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaactg atcttcagca	1860

65

ES 2 346 219 T3

	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	1920
	aaggggaataa	gggcgacacg	gaaatgttga	atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	1980
5	tgaagcattt	atcaggggta	ttgtctcatg	cgcgataca	tatttgaatg	tatttagaaa	2040
	aataaaca	aaa taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	tgccacctga	cgtcgc	2096
10	<210> 10						
	<211> 238						
	<212> ADN						
15	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> MCS de plásmido SV3						
20	<400> 10						
	cgctgagcgt	aatacgactc	actataggga	ggccctgtac	gtagcggccg	cgtcgacgat	60
25	atcggagctg	ctgggcccag	ggagcttcta	gaggagctgg	atccgctgga	gaattcggag	120
	ctggaaagct	tggagctgct	ctgcagggag	ctgcatgcgc	tggcgcacag	ctgatttaaa	180
30	tcggtccgcg	tacgtccgga	ttcccttag	tgagggttaa	ttgtttaaac	gctcttcc	238
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							