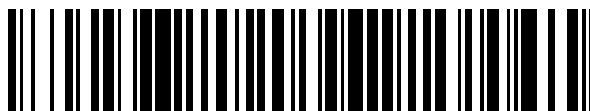


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 508**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 15/49 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
C07K 14/155 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2001 E 10158183 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2194137**

54 Título: **Células que comprenden partículas lentivíricas con codones optimizados**

30 Prioridad:

19.04.2000 GB 0009760

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)
Windrush Court, Transport Way
Oxford, OX4 6LT, GB**

72 Inventor/es:

**KINGSMAN, ALAN JOHN;
KIM, NARRY;
KOTSOPOULOU, EKATERINI;
ROHLL, JONATHAN y
MITROPHANOUS, KYRIACOS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 618 508 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células que comprenden partículas lentivíricas con codones optimizados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para mejorar la seguridad de vectores retrovíricos capaces de suministrar genes terapéuticos para su uso en terapia génica, y a nuevas secuencias nucleotídicas para su uso en dichos métodos.

10 Antecedentes de la invención

Los vectores retrovíricos ahora se usan ampliamente como vehículos para suministrar genes en células. Su popularidad deriva del hecho de que son fáciles de producir y de que median la integración estable del gen que portan en el genoma de la célula diana. Esto permite la expresión a largo plazo del gen suministrado (1).

20 Durante un tiempo, ha habido un considerable interés en el desarrollo de sistemas de vectores retrovíricos basados en lentivirus. Los lentivirus son un pequeño subgrupo de retrovirus complejos. Contienen, además de los genes retrovíricos comunes (*gag*, *pol* y *env*), genes que les permiten regular su ciclo de vida e infectar células que no se dividen (2). Por lo tanto, los sistemas de vectores basados en los mismos son de interés debido a su uso potencial en la transferencia de un gen de interés a células que no se dividen, tales como las neuronas. Además, los vectores lentivíricos permiten la expresión muy estable a largo plazo del gen de interés. Este se ha demostrado que es de al menos tres meses para las células neuronales de rata transducidas, mientras que los vectores a base de MLV solo pudieron expresar el gen de interés durante seis semanas.

25 El lentivirus más comúnmente usado es el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el agente etiológico del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Los vectores a base de VIH han mostrado transducir eficazmente las células que no se dividen (3), y se pueden usar, por ejemplo, para dirigir genes terapéuticos anti-VIH hacia células susceptibles al VIH. Sin embargo, los vectores a base de VIH tienen un número de desventajas significativas que pueden limitar su aplicación terapéutica a ciertas enfermedades. En concreto, el VIH-1 es un patógeno humano que porta proteínas y secuencias potencialmente oncogénicas. Existe el riesgo de que la introducción de partículas vectoriales producidas en células que se empaquetan, que expresan *gag-pol* del VIH, introducirán estas proteínas en el paciente, conduciendo a la seroconversión.

35 Por lo tanto, se ha hecho énfasis en la seguridad de estos vectores. Una estrategia se centra en el diseño de sistemas de producción para vectores retrovíricos. Un sistema de vector retrovílico consiste básicamente en dos elementos, una línea celular de empaquetamiento y un genoma del vector. La línea de empaquetamiento más simple consiste en un provirus en el que se ha eliminado la secuencia ψ (un determinante del empaquetamiento del ARN que, en el VIH, se encuentra entre U5 y *gag*). Cuando se transfectan de forma estable en una célula, se producirán partículas víricas que contendrán transcriptasa inversa, pero el ARN viriónico no se empaquetará dentro de estas partículas. El componente de complementación en un sistema de vector retrovílico es el propio vector genómico. El vector genómico necesita contener una secuencia de empaquetamiento, pero se puede eliminar gran parte de las regiones codificantes estructurales. Se suele incorporar en el vector un gen marcador seleccionable u otra secuencia nucleotídica de interés. Entonces, se pueden usar las reservas de vectores de la línea de empaquetamiento para infectar células diana. Si la célula es infectada con éxito por la partícula vírica, la secuencia del vector genómico será transcrita de forma inversa e integrada por la maquinaria retrovítica. Sin embargo, la infección es un proceso final, por lo que no debería ocurrir ninguna replicación o propagación posterior del vector.

50 No obstante, como se ha indicado anteriormente, se encuentran problemas en el diseño de vectores retrovíricos seguros y eficaces. Estos incluyen la posibilidad de que la recombinación entre el vector de empaquetamiento y la secuencia de empaquetamiento pueda conducir a la generación del virus competente para la replicación de tipo silvestre. Por consiguiente, se han realizado esfuerzos para mejorar la seguridad de las construcciones de células de empaquetamiento.

55 En las líneas celulares de empaquetamiento de segunda generación, además de la eliminación de la secuencia de empaquetamiento, también se eliminó la LTR de 3', de forma que se requieren dos recombinaciones para generar un virus de tipo silvestre.

60 En las líneas de empaquetamiento de tercera generación, los genes *gag-pol* y el gen *env* se sitúan en construcciones separadas que se introducen secuencialmente en las células de empaquetamiento para evitar la recombinación durante la transfección.

65 Con respecto a la señal de empaquetamiento, el documento EP 0 368 882A (Sodroski) desvela que, en el VIH, ello corresponde a la región entre el donante de corte y empalme principal de 5' y el codón de inicio de *gag*, y en particular, corresponde a un segmento justo cadena abajo del donante de corte y empalme principal de 5', y aproximadamente 14 bases cadena arriba del codón de iniciación de *gag*. Es esta región la que, según las

enseñanzas de Sodroski, se debe de eliminar del casete de *gag-pol*. El documento WO 97/12622 (Verma) describe que, en el VIH-1, se puede realizar una eliminación interna de 39 pb en la secuencia ψ entre el sitio donante de corte y empalme de 5' y el codón de inicio del gen *gag*.

Se puede usar el movimiento de codones para reducir la frecuencia de recombinación, manteniendo a la vez la secuencia proteica primaria de las construcciones, véase (4), en la que la región de solapamiento entre las construcciones de expresión de *gag-pol* y *env* se redujo hasta 61 pb que se extienden a lo largo de la región común entre *pol* y *env* que están en diferentes fases de lectura. Se introdujeron mutaciones de transversión en los 20 codones finales de *pol*, conservando la integridad de la región codificante y reduciendo, a la vez, la homología con *env* hasta un 55 % en la región de solapamiento. De igual manera, se introdujeron mutaciones de movimiento en el 3' de *env*, y se eliminaron todas las secuencias de cadena abajo del codón de parada de *env*.

Los vectores eficientes normalmente contienen parte de *gag* en el vector genómico, para aumentar el título de viriones. A diferencia de la secuencia de empaquetamiento, que puede estar en cualquier posición dentro de una secuencia para efectuar el empaquetamiento, la secuencia de *gag* debe de estar en su posición nativa adyacente a ψ para que tenga algún efecto.

Se apreciará que, aunque se pueden hacer mejoras significativas en el diseño de las células de empaquetamiento y de los vectores, todavía hay alcance para un perfeccionamiento adicional de las líneas de empaquetamiento actuales.

Los documentos WO 00/55341 y WO 99/41397 se refieren a vectores víricos capaces de suministrar moléculas de ARN inhibitoras anti-víricas a células diana, en particular, para el tratamiento del SIDA y de la infección por VIH.

El documento WO 00/15819 se refiere a líneas celulares de empaquetamiento para producir una partícula retroviral derivada de lentivirus independiente de proteínas víricas auxiliares que comprende una secuencia codificante del lentivirus *gag-pol* que está optimizada en sus codones. Zufferey R. *et al.*, *Journal of Virology*, diciembre de 1998, pág. 9873-9880, que describe vectores lentivíricos de autoinactivación para el suministro seguro y eficaz de genes *in vivo*.

Sumario de la invención

Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar partículas retrovíricas, en particular, partículas lentivíricas, y concretamente las que portan construcciones nucleotídicas que codifican proteínas terapéuticas, que sean más seguras con respecto a la partícula vírica de tipo silvestre correspondiente. En el documento de los presentes inventores WO 99/41397, se describe la optimización de los codones de los genes *gag-pol* como un medio para cumplir el requisito de Rev/RRE para exportar y para potenciar la estabilidad del ARN. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto ahora que la secuencia de *gag-pol* con codones optimizados resuelve los posibles problemas de recombinación con los genomas vectoriales que portan parte de una secuencia de *gag* con el objeto de aumentar el título. Esta estrategia también evita la necesidad de usar regiones de *gag* de diferentes virus en las construcciones de empaquetamiento y de genomas vectoriales.

Otra ventaja significativa proporcionada por la invención es que la optimización de los codones interrumpe las estructuras secundarias de ARN, tales como la señal de empaquetamiento, volviendo así al ARNm de *gag-pol* no empaquetable. Así pues, la presente invención permite la conservación de la secuencia retroviral cadena arriba del codón de inicio de *gag*, en contraste con Sodroski y Verma, sin comprometer significativamente la seguridad.

Exposición de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de un vector de VIH de replicación defectuosa, que comprende transfectar una célula productora con lo siguiente:

- i) un genoma del VIH que comprende un nucleótido de interés (NOI), una señal de empaquetamiento y RRE;
- ii) una secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH; y
- iii) una secuencia nucleotídica que codifica una proteína env; caracterizado por que la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH está optimizada en sus codones para la expresión en la célula productora, a excepción de la secuencia que engloba el sitio de desplazamiento de fase de lectura, y en el que (ii) no comprende RRE; en el que la célula productora expresa rev y en el que el vector de VIH es un vector de autoinactivación.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula productora de partículas de vector de VIH que comprende:

- i) un genoma del VIH que comprende al menos una secuencia nucleotídica de interés, señal de empaquetamiento y RRE; y
- ii) una secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH; y
- iii) una secuencia nucleotídica que codifica una proteína env; caracterizada por que la secuencia nucleotídica

que codifica las proteínas gag y pol del VIH está optimizada en sus codones para la expresión en la célula productora, a excepción de la secuencia que engloba el sitio de desplazamiento de fase de lectura, y en la que (ii) no comprende RRE; en la que la célula productora expresa *rev* y en la que el vector de VIH es un vector de autoinactivación.

5 También se proporcionan nuevas secuencias con codones optimizados como la mostrada en SEC ID NO: 15, que se puede usar en la presente invención. Sin embargo, se apreciará que, en la invención, es posible emplear cualquier secuencia de *gag-pol* conveniente con codones optimizados.

10 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula productora de acuerdo con la presente invención, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "reducir" pretende significar que la posibilidad de que ocurra un suceso se reduce en comparación con una población comparable que tiene la secuencia de *gag-pol* de tipo silvestre. Dentro de una población, se puede evitar la posibilidad de que ocurra un suceso para un vector retroviral o una partícula retroviral individual.

15 Descripción detallada de la invención

A continuación, se describirán, a modo de ejemplo no limitante, diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención.

La presente invención emplea el concepto de optimización de codones.

25 La optimización de los codones se ha descrito previamente en el documento de los presentes inventores WO 99/41397 como un medio para cubrir el requisito de *Rev/RRE* para exportar y potenciar la estabilidad del ARN. Las alteraciones en la secuencia codificante para los componentes víricos mejoran las secuencias en cuanto al uso de los codones en las células de mamífero u otras células que vayan a actuar como las células productoras para la producción de partículas del vector retroviral. Esta mejora en el uso de los codones se denomina "optimización de los codones". Muchos virus, incluyendo el VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones raros, y, cambiándolos para que correspondan a codones de mamífero comúnmente usados, se puede lograr el aumento de la expresión de los componentes del empaquetamiento en las células productoras de mamífero. En la técnica, se conocen tablas de uso de codones para las células de mamífero, así como para una variedad de otros organismos.

35 En virtud de las alteraciones en sus secuencias, las secuencias nucleotídicas que codifican los componentes de empaquetamiento de las partículas víricas que se requieren para el ensamblaje de las partículas víricas en las células productoras/células de empaquetamiento tienen eliminadas de las mismas las secuencias de inestabilidad (INS) del ARN. Al mismo tiempo, se conserva la secuencia codificante de aminoácidos para los componentes de empaquetamiento, de forma que los componentes víricos codificados por las secuencias permanecen invariables, o son al menos suficientemente similares, de modo que la función de los componentes del empaquetamiento no se ve comprometida.

45 La expresión "polipéptido vírico requerido para el ensamblaje de las partículas víricas" significa un polipéptido codificado normalmente por el genoma vírico para su empaquetamiento en partículas víricas, en cuya ausencia, el genoma vírico no se puede empaquetar. Por ejemplo, en el contexto de los retrovirus, dichos polipéptidos incluirían *gag-pol* y *env*. La expresión "componente de empaquetamiento" también se incluye dentro de dicha definición.

50 Como se trata en el documento WO 99/32646, los requisitos de secuencias para los genomas de vectores de VIH de empaquetamiento son complejos. La señal de empaquetamiento del VIH-1 engloba el sitio donante de corte y empalme, y contiene una parte de la región no traducida en 5' del gen *gag*, que tiene una estructura secundaria putativa que contiene 4 estructuras de tallo-lazo cortas. Sin embargo, también se sabe que las secuencias adicionales de cualquier otra parte del genoma son importantes para el encapsidamiento eficaz del VIH. Por ejemplo, los primeros 350 pb de la secuencia codificante de la proteína *gag* pueden contribuir al empaquetamiento eficiente. Por lo tanto, para la construcción de vectores de VIH-1 capaces de expresar genes heterólogos, se ha usado, en el genoma vectorial, una señal de empaquetamiento que se extiende hasta 350 pb de la región codificante de la proteína *gag*. Ahora se ha descubierto que la optimización de los codones de la región codificante de *gag* en el vector de empaquetamiento, al menos en la región en la que se extiende la señal de empaquetamiento, también tiene el efecto de interrumpir el empaquetamiento del genoma del vector. Así pues, la optimización de los codones es un nuevo método de obtención de una partícula vírica de replicación defectuosa.

60 También, como se desvela en el documento WO 99/32646, la estructura de la señal de empaquetamiento de los lentivirus equinos es diferente de la del VIH. En lugar de una secuencia corta de 4 estructuras de tallo-lazo junto con una señal de empaquetamiento que se extiende hasta 350 pb de la región codificante de la proteína *gag*, se ha descubierto que, en los lentivirus equinos, la señal de empaquetamiento puede que no se extienda tanto en la región codificante de la proteína *gag* como se podía haber pensado.

65 En un aspecto, solo los codones que están relacionados con la señal de empaquetamiento son codones

optimizados. Así pues, la optimización de los codones se extiende a al menos los primeros 350 pb de la región codificante de la proteína *gag*. En los lentivirus equinos, al menos, la optimización de los codones se extiende al menos hasta el nucleótido 300 de la región codificante de *gag*, más preferentemente hasta al menos el nucleótido 150 de la región codificante de *gag*. Aunque no es óptimo, la optimización de los codones se podría extender hasta, digamos, solo los primeros 109 nucleótidos de la región codificante de *gag*. También puede ser posible que la optimización de los codones se extienda hasta solo el primer codón de la región codificante de *gag*.

Sin embargo, en la presente invención, las secuencias están optimizadas en los codones en su totalidad, a excepción de la secuencia que engloba el sitio de desplazamiento de fase. El gen *gag-pol* comprende dos fases de lectura que se solapan, que codifican las proteínas *gag* y *pol*, respectivamente. La expresión de ambas proteínas depende de un desplazamiento de la fase durante la traducción. Este desplazamiento de la fase se produce como resultado del "deslizamiento" del ribosoma durante la traducción. Se cree que este deslizamiento está provocado, al menos en parte, por estructuras secundarias de ARN que detienen el ribosoma. Dichas estructuras secundarias existen cadena abajo del sitio de desplazamiento de la fase en el gen *gag-pol*. Para el VIH, la región de solapamiento se extiende desde el nucleótido 1.222 cadena abajo del comienzo de *gag* (en el que el nucleótido 1 es A del ATG de *gag*) hasta el final de *gag* (nucleótido 1.503). Por consiguiente, un fragmento de 281 pb que se extiende desde el sitio de desplazamiento de la fase y la región de solapamiento de las dos fases de lectura preferentemente está optimizado en sus codones. La conservación de este fragmento permitirá una expresión más eficiente de las proteínas *gag-pol*.

Se pueden hacer derivaciones a partir del uso de codones óptimos, por ejemplo, para acomodar los sitios de restricción convenientes, y se pueden introducir en las proteínas *gag-pol* cambios de aminoácidos conservativos.

En una realización muy preferida, la optimización de los codones se basó en genes de mamíferos ligeramente expresados. Se puede cambiar la tercera y, a veces, la segunda y tercera base. En la Figura 3b, se da un ejemplo de una tabla de uso de codones.

Debido a la naturaleza degenerativa del Código Genético, se apreciará que son numerosas las secuencias de *gag-pol* que el experto puede realizar. Además, hay muchas variantes retrovíricas descritas y que se pueden usar como punto de partida para generar una secuencia de *gag-pol* con codones optimizados. Los genomas lentivíricos pueden ser bastante variables. Por ejemplo, hay muchas cuasiespecies del VIH-1 que todavía son funcionales. Este es el caso del EIAV. Estas variantes se pueden usar para potenciar determinadas partes del proceso de transducción. Los ejemplos de variantes del VIH-1 se pueden encontrar en <http://hiv-web.lanl.gov>. Los detalles de los clones de EIAV se pueden encontrar en la base de datos del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Puesto que la optimización de los codones puede dar como resultado la interrupción de las estructuras secundarias del ARN tales como una señal de empaquetamiento, se apreciará que se podría conservar cualquier señal de empaquetamiento endógena cadena arriba del codón de inicio de *gag* sin comprometer la seguridad.

Una ventaja adicional de los componentes de empaquetamiento con codones optimizados es que esto puede aumentar la expresión del gen. En particular, puede hacer que la expresión de *gag-pol* sea independiente de Rev. Para permitir el uso de factores anti-*rev* o RRE en el vector retrovírico, sin embargo, sería necesario volver al sistema de generación del vector vírico totalmente independiente de Rev/RRE (5). Así pues, también es necesario modificar el genoma. Esto se logra optimizando componentes del genoma del vector. Ventajosamente, estas modificaciones también conducen a la producción de un sistema más seguro ausente de todas las proteínas auxiliares tanto en la célula productora como en la célula transducida, y se describen más adelante.

Como se ha descrito anteriormente, los componentes de empaquetamiento para un vector retrovírico incluyen productos de expresión de genes *gag*, *pol* y *env*. Además, el empaquetamiento eficiente depende de una secuencia corta de 4 estructuras de tallo-lazo, seguida de una secuencia parcial de *gag* y *env* (la "señal de empaquetamiento"). Por lo tanto, la inclusión de una secuencia de *gag* eliminada en el genoma del vector retrovírico (además de la secuencia de *gag* completa en la construcción de empaquetamiento) optimizará el título del vector. Hasta la fecha, se ha publicado que un empaquetamiento eficiente requiere de 255 a 360 nucleótidos de *gag* en vectores que todavía conservan secuencias de *env*, o aproximadamente 40 nucleótidos de *gag* en una combinación particular de mutación de donante de corte y empalme, eliminaciones de *gag* y *env*. Sorprendentemente se ha descubierto que una eliminación de hasta 360 nucleótidos en *gag* conduce a un aumento en el título del vector. Otras eliminaciones dieron lugar a títulos inferiores. Se descubrió que mutaciones adicionales en el sitio del donante de corte y empalme principal cadena arriba de *gag* interrumpe la estructura secundaria de la señal de empaquetamiento y, por lo tanto, conduce a una reducción del título de vectores. Por lo tanto, preferentemente, el genoma del vector retrovírico incluye una secuencia de *gag* a partir de la que se han eliminado hasta 360 nucleótidos.

Por lo tanto, los presentes inventores permiten la preparación de un sistema denominado "mínimo" en el que se pueden eliminar todos los genes accesorios. En el VIH, estos genes accesorios son *vpr*, *vif*, *tat*, *nef*, *vpu* y *rev*. De igual manera, en otros lentivirus, se pueden eliminar los genes accesorios análogos normalmente presentes en el lentivirus. Sin embargo, para evitar dudas, cabría mencionar que la presente invención también se extiende a sistema, partículas y vectores en los que uno o más de estos genes accesorios están presentes y en cualquier

combinación.

La expresión "vector vírico" se refiere a una construcción nucleotídica que comprende un genoma vírico capaz de ser transcrito en una célula hospedadora, cuyo genoma comprende suficiente información genética vírica para permitir el empaquetamiento del genoma de ARN vírico, en presencia de componentes de empaquetamiento, en una partícula vírica capaz de infectar una célula diana. La infección de la célula diana incluye la transcripción inversa y la integración en el genoma de la célula diana, cuando sea apropiado para determinados virus. El vector vírico en uso normalmente porta secuencias codificantes heterólogas (nucleotídicos de interés o "NOI") que son suministrados mediante el vector a la célula diana, por ejemplo, una primera secuencia nucleotídica que codifica una ribozima. La expresión "replicación defectuosa" pretende significar que un vector vírico es incapaz de replicarse independientemente para producir partículas víricas infecciosas en la célula diana final.

La expresión "sistema de vector vírico" pretende significar un kit de partes que se puede usar cuando se combina con otros componentes necesarios para la producción de partículas víricas con el fin de producir partículas víricas en células hospedadoras. Por ejemplo, un NOI puede estar presente normalmente en una construcción de vector plasmídico adecuada para clonar el NOI en una construcción de vector de genoma vírico. Cuando se combina en un kit con una secuencia nucleotídica adicional, que también estará normalmente presente en una construcción de vector plasmídico separada, la combinación resultante de plásmido que contiene el NOI y el plásmido que contiene la secuencia nucleotídica adicional comprende los elementos esenciales de la invención. Dicho kit puede ser usado entonces por el experto en la producción de construcciones de genomas de vectores víricos adecuadas que, cuando se transfectan en una célula hospedadora junto con el plásmido que contiene la secuencia nucleotídica adicional, y opcionalmente construcciones de ácido nucleico que codifican otros componentes requeridos para el ensamblaje vírico, conducirá a la producción de partículas víricas infecciosas.

Como alternativa, la secuencia nucleotídica adicional puede estar presente de forma estable dentro de una línea celular de empaquetamiento que está incluida en el kit.

El kit puede incluir el resto de componentes necesarios para producir partículas víricas, tales como células hospedadoras y otros plásmidos que codifican polipéptidos víricos esenciales requeridos para el ensamblaje vírico. A modo de ejemplo, el kit puede contener (i) un plásmido que contenga un NOI; e (ii) un plásmido que contenga una secuencia nucleotídica adicional codificante de una construcción retrovítica de *gag-pol* modificada que se ha con codones optimizados para la expresión en una productora de elección. Los componentes opcionales serían entonces (a) una construcción de genoma retrovítico con sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados para clonar el NOI en el genoma vírico, opcionalmente, con al menos una secuencia de *gag* parcial; (b) un plásmido codificante de una proteína *env* de VSV-G. Como alternativa, la secuencia nucleotídica que codifica polipéptidos víricos requeridos para el ensamblaje de partículas víricas se puede proporcionar en el kit como líneas de células de empaquetamiento que comprenden las secuencias nucleotídicas, por ejemplo, una línea celular que expresa VSV-G.

La expresión "sistema de producción de vector vírico" se refiere al sistema de vector vírico descrito anteriormente en el que el NOI ya se ha insertado en un genoma de vector vírico adecuado.

En la presente invención, varios términos se usan indistintamente. Por lo tanto, "virión", "virus", "partícula vírica", "partícula retrovítica", "retrovirus" y "partícula vectorial" significan virus y partículas de tipo virus que son capaces de introducir un ácido nucleico en una célula a través de un mecanismo de entrada de tipo vírico. Dichas partículas vectoriales pueden, en determinadas circunstancias, mediar la transferencia de los NOI a las células que infectan. Un retrovirus es capaz de transcribir de forma inversa su material genético en ADN, e incorporar este material genético en un ADN de la célula diana con la transducción. Dichas células se denominan en el presente documento como "células diana".

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula diana" se refiere simplemente a una célula cuyo vector retrovítico regulado de la presente divulgación, bien nativo o diana, es capaz de infectar o transducir.

Una partícula de vector lentivírico será capaz de transducir células que se dividen lentamente y que los no lentivirus tales como MLV no serían capaces de transducir eficazmente. Las células que se dividen lentamente se dividen una vez aproximadamente cada tres a cuatro días, incluyendo ciertas células tumorales. Aunque los tumores contienen células que se dividen rápidamente, algunas células tumorales, en especial, las del centro del tumor, rara vez se dividen.

Como alternativa, la célula diana puede ser una célula con crecimiento detenido, capaz de sufrir una división celular, tal como una célula de una parte central de una masa tumoral, o una célula madre tal como una célula madre hematopoyética o una célula positiva en CD34.

Como alternativa adicional, la célula diana puede ser un precursor de una célula diferenciada tal como un precursor monocítico, una célula positiva en CD33 o un precursor de mielóide.

Como una alternativa adicional, la célula diana puede ser una célula diferenciada, tal como una neurona, un astrocito, un gliocito, un microgliocito, un macrófago, un monocito, una célula epitelial, una célula endotelial, un hepatocito, un espermatozoido, una espermátida o un espermatozoide.

- 5 Las células diana se pueden transducir bien *in vitro* tras el aislamiento de un individuo humano, o se pueden transducir directamente *in vivo*.

Los vectores víricos para su uso de acuerdo con la invención son vectores del VIH.

- 10 El término "derivable" se usa en su sentido normal, pretendiendo significar una secuencia nucleotídica, tal como una LTR o una parte de la misma, que no necesita necesariamente ser obtenida de un vector, tal como un vector retroviral, sino que, en cambio, podría derivar del mismo. A modo de ejemplo, la secuencia se puede preparar sintéticamente o mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

- 15 Los detalles sobre la estructura genómica de algunos retrovirus se pueden encontrar en la técnica. A modo de ejemplo, los detalles sobre el VIH y Mo-MLV se pueden encontrar en el NCBI Genbank (Números de Acceso del Genoma AF033819 y AF033811, respectivamente). Los detalles de las variantes del VIH también se pueden encontrar en <http://hiv-web.lanl.gov>. Los detalles de las variantes de EIAV se pueden a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- 20 La estructura básica de un genoma de un retrovirus es una LTR de 5' y una LTR de 3', entre o en las que se sitúan una señal de empaquetamiento para permitir que el genoma se empaquete, un sitio de unión al cebador, sitios de integración para permitir la integración en un genoma de la célula hospedadora y los genes *gag*, *pol* y *env* que codifican los componentes del empaquetamiento - estos son polipéptidos requeridos para el ensamblaje de partículas víricas. Los retrovirus más complejos tienen características adicionales, tales como las secuencias *rev* y RRE en el VIH, que permiten la exportación eficiente de las transcripciones de ARN del provirus integrado desde el núcleo al citoplasma de una célula diana infectada.

- 30 En el provirus, estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración proviral y de la transcripción. Las LTR también sirven como secuencias promotoras potenciadoras, y pueden controlar la expresión de los genes víricos. El encapsidamiento de los ARN retrovíricos se produce en virtud de una secuencia de *psi*, que se ha desvelado que, con respecto al VIH, al menos, está situada en el extremo 5' del genoma vírico.

- 35 Las propias LTR son secuencias idénticas que se pueden dividir en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 deriva de la secuencia única al extremo 3' del ARN. R deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN, y U5 deriva de la secuencia única al extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus.

- 40 En un vector retroviral defectuoso, *gag*, *pol* y *env* pueden estar ausentes o no ser funcionales. Las regiones R de ambos extremos del ARN son secuencias repetidas. U5 y U3 representan secuencias únicas en los extremos 5' y 3' del genoma de ARN, respectivamente.

- 45 Como se ha tratado anteriormente, en un vector retroviral típico para su uso en terapia génica, al menos parte de una o más de las regiones codificantes de las proteínas *gag*, *pol* y *env*, esenciales para la replicación, se pueden eliminar del vector retroviral. Esto hace al vector retroviral defectuoso para la replicación. Las partes eliminadas se pueden reemplazar incluso por una secuencia nucleotídica de interés (NOI), como en la presente invención, para generar un virus capaz de integrar su genoma en un genoma hospedador, pero en el que el genoma vírico modificado es incapaz de propagarse por sí mismo debido a la falta de proteínas estructurales. Cuando se integra en el genoma hospedador, se produce la expresión del NOI - generando, por ejemplo, un efecto terapéutico y/o de diagnóstico. Por lo tanto, la transferencia de un NOI a un sitio de interés normalmente se logra: integrando el NOI en el vector vírico recombinante; empaquetando el vector vírico modificado en una cubierta viriónica; y permitiendo la transducción de un sitio de interés - tal como una célula diana o una población de células diana.

- 50 Por lo tanto, un genoma retroviral mínimo para su uso en la presente invención puede comprender (5')R-U5-uno o más NOI-U3-R(3'). Sin embargo, el vector plasmídico usado para producir el genoma retroviral en una célula hospedadora/célula de empaquetamiento también incluirá secuencias de control reguladoras de la transcripción unidas de forma operativa al genoma retroviral para dirigir la transcripción del genoma en una célula hospedadora/célula de empaquetamiento. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas con la secuencia retroviral transcrita, es decir, la región U3 de 5', o pueden ser un promotor heterólogo, tal como otro promotor vírico, por ejemplo, el promotor de CMV.

- 60 Algunos genomas retrovíricos requieren secuencias adicionales para la producción eficiente del virus. Por ejemplo, en el caso del VIH, se debería incluir la secuencia de *rev* y RRE. Sin embargo, se ha descubierto que el requisito para *rev* y RRE se puede reducir o eliminar mediante la optimización de los codones. Dado que la expresión de *gag-pol* con codones optimizados es independiente de REV, se puede eliminar RRE del casete de expresión de *gag-pol*,

eliminando así cualquier posibilidad de recombinación con cualquier RRE contenido en el genoma del vector.

Una vez, es necesario expresar las secuencias de los NOI del vector retrovítico. En un retrovirus, el promotor se sitúa en la región U3 de LTR 5' del provirus. En los vectores retrovíticos, el promotor que conduce la expresión de un gen terapéutico puede ser el promotor retrovítico nativo en la región U3 de 5', o un promotor alternativo diseñado mediante ingeniería en el vector. El promotor alternativo puede reemplazar físicamente al promotor U3 de 5' nativo en el retrovirus o se puede incorporar en un sitio diferente dentro del genoma del vector, tal como entre las LTR.

Por lo tanto, el NOI también estará unido de forma operativa a una secuencia de control reguladora de la transcripción para permitir que se produzca la transcripción de la primera secuencia nucleotídica en la célula diana. La secuencia de control normalmente será activa en células de mamífero. La secuencia de control puede ser, por ejemplo, un promotor vírico tal como el promotor vírico natural o un promotor de CMV, o puede ser un promotor de mamífero. Se prefiere usar en particular un promotor que sea preferentemente activo en un determinado tipo de célula o de tejido, en el que el virus que se va a tratar infecte principalmente. Por lo tanto, en una realización, se pueden usar secuencias reguladoras específicas de tejidos. Las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la una o más primeras secuencias nucleotídicas pueden ser promotores constitutivos o regulados.

La expresión "unida de forma operativa" indica una relación entre una región reguladora (normalmente un elemento promotor, pero puede incluir un elemento potenciador) y la región codificante de un gen, mediante la que la transcripción de la región codificante está bajo el control de la región reguladora.

Como se usa en el presente documento, el término "potenciador" incluye una secuencia de ADN que se une a otros componentes proteicos del complejo de iniciación de la transcripción y facilita así el inicio de la transcripción dirigida por su promotor asociado.

En una realización preferida de la presente invención, el potenciador es un elemento de respuesta de tipo isquémico (ILRE).

La expresión "elemento de respuesta de tipo isquémico" - escrito de otro modo como ILRE - incluye un elemento que es sensible a o es activo en condiciones de isquemia o condiciones que son similares a la isquemia o están provocadas por la isquemia. A modo de ejemplo, las condiciones que son similares a la isquemia o que están provocadas por la isquemia incluyen la hipoxia y/o una o varias concentraciones bajas de glucosa.

El término "hipoxia" significa un estado en el que un determinado órgano o tejido recibe un suministro inadecuado de oxígeno.

La isquemia puede ser un suministro insuficiente de sangre a un órgano o tejido específico. Una consecuencia de la reducción del suministro de sangre es un suministro inadecuado de oxígeno al órgano o tejido (hipoxia). La hipoxia prolongada puede dar lugar a una lesión en el órgano o tejido afectado.

Un ILRE preferido es un elemento de respuesta a la hipoxia (HRE).

En una realización preferida de la presente invención, hay una expresión regulable por la hipoxia o la isquemia de los componentes del vector retrovítico. En este sentido, la hipoxia es un potente regulador de la expresión génica en un amplio intervalo de diferentes tipos celulares, y actúa mediante la inducción de la actividad de factores de transcripción inducibles por la hipoxia, tales como el factor 1 inducible por la hipoxia (HIF-1; 6); que se une a sitios de reconocimiento de ADN afines, los elementos sensibles a la hipoxia (HRE) en diversos promotores génicos. Dachs *et al.* (7) han usado una forma multimérica del HRE del gen de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK-1) de ratón (8) para controlar la expresión de genes tanto marcadores como terapéuticos mediante células de fibrosarcoma humano en respuesta a la hipoxia *in vitro* y dentro de tumores sólidos *in vivo* (7 *ibid*).

Los elementos potenciadores de la respuesta a la hipoxia (HREE) también se han resultado estar en asociación con un número de genes, incluyendo el gen de la eritropoyetina (EPO) (9; 10). Otros HREE se han aislado de regiones reguladoras tanto del gen de la enzima glucolítica muscular piruvato quinasa (PKM) (11), el gen de β -enolasa específico del músculo humano (ENO3; 12) como el gen de endotelina-1 (ET-1) (13).

Preferentemente, el HRE para el uso de acuerdo con la presente invención se selecciona, por ejemplo, entre el elemento HRE de eritropoyetina (HREE1), el elemento HRE de piruvato quinasa (PKM) muscular, el HRE de fosfoglicerato quinasa (PGK), el elemento HRE de B-enolasa (enolasa 3; ENO3), el elemento HRE de endotelina-1 (ET-1) y el elemento HRE de metalotioneína II (MTII).

Preferentemente, el ILRE se usa en combinación con un elemento regulador de la transcripción, tal como un promotor, elemento regulador de la transcripción que es preferentemente activo en uno o más tipos de células seleccionados, siendo preferentemente activo solo en un tipo de célula.

Como se ha perfilado anteriormente, este aspecto de combinación se denomina elemento sensible.

Preferentemente, el elemento sensible comprende al menos el ILRE como se define en el presente documento.

Los ejemplos no limitantes de dicho elemento sensible se presentan como OBHRE1 y XiaMac. Otro ejemplo no limitante incluye el ILRE en uso conjuntamente con un promotor de MLV y/o un promotor sensible a la isquemia restringido a los tejidos. Estos elementos sensibles se desvelan en el documento WO99/15684.

Otros ejemplos de promotores/potenciadores adecuados restringidos a los tejidos son aquellos que son muy activos en las células tumorales, tales como un promotor/potenciador de un gen *MUC1*, un gen *CEA* o un gen antigénico 5T4. El promotor de alfa-fetoproteína (AFP) es también un promotor específico de los tumores. Una combinación preferida de promotor/potenciador es una combinación del promotor/potenciador temprano inmediato principal (MIE) del citomegalovirus humano (hCMV).

El término "promotor" se usa en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de unión a ARN polimerasa.

El promotor puede estar situado en la LTR de 5' retroviral para controlar la expresión de un ADNc codificante de un NOI, y/o proteínas gag-pol.

Preferentemente, el NOI y/o las proteínas *gag-pol* pueden ser expresados a partir del genoma del retrovirus, tal como a partir de promotores retrovirales endógenos en la repetición terminal larga (LTR).

Preferentemente, el NOI y/o las proteínas gag-pol se expresan a partir de un promotor heterólogo al que está unido de forma operativa el gen o secuencia heteróloga, y/o la secuencia de *gag-pol* con codones optimizados.

Como alternativa, el promotor puede ser un promotor interno.

Preferentemente, el NOI se expresa a partir de un promotor interno.

Los vectores que contienen promotores internos también se han usado ampliamente para expresar múltiples genes. Un promotor interno hace posible aprovechar las combinaciones de promotor/potenciador distintas de las encontradas en la LTR viral para conducir la expresión génica. En un vector retroviral, se pueden incluir múltiples promotores internos, y se ha demostrado que es posible expresar al menos tres ADNc diferentes, cada uno procedente de su propio promotor (14). Los elementos de sitios de entrada ribosómicos internos (IRES) también se han usado para permitir la traducción de múltiples regiones codificantes procedentes bien de un solo ARNm o de proteínas de fusión que luego se pueden expresar a partir de una fase de lectura abierta.

El promotor puede ser constitutivamente eficiente o puede estar restringido temporalmente en su actividad.

Preferentemente, el promotor es un promotor constitutivo tal como CMV.

Preferentemente, los promotores son específicos de tejidos. Es decir, son capaces de conducir la transcripción de un NOI o varios NOI en un tejido mientras que permanecen en buena parte "silenciosos" en otros tipos de tejidos.

La expresión "específico de tejidos" significa un promotor cuya actividad no se restringe a un solo tipo de tejido, pero que, no obstante, muestra selectividad por cuanto puede ser activo en un grupo de tejidos y menos activo o "silencioso" en otro grupo.

El nivel de expresión de uno o varios NOI bajo el control de un determinado promotor se puede modular manipulando la región promotora. Por ejemplo, dominios diferentes dentro de una región promotora pueden poseer diferentes actividades reguladoras génicas. Los papeles de estas diferentes regiones normalmente se evalúan usando construcciones vectoriales que tienen diferentes variantes del promotor con regiones específicas eliminadas (es decir, análisis de eliminación). Esta metodología se puede usar para identificar, por ejemplo, la región más pequeña capaz de conferir especificidad tisular o la región más pequeña que confiere sensibilidad a la hipoxia.

Hay un número de promotores específicos de tejidos, descritos anteriormente, que pueden ser particularmente ventajosos. En la mayoría de los casos, estos promotores se pueden aislar como fragmentos de digestión de restricción convenientes, adecuados para la clonación en un vector seleccionado. Como alternativa, los fragmentos de promotores se pueden aislar usando la reacción en cadena de la polimerasa. La clonación de los fragmentos amplificados se puede facilitar incorporando sitios de restricción en el extremo 5' de los cebadores.

El uno o varios NOI pueden estar bajo el control de la expresión de un elemento regulador de la expresión, tal como un promotor y potenciador.

Preferentemente, el promotor sensible a la isquemia es un promotor sensible a la isquemia restringido a tejidos.

Preferentemente, el promotor sensible a la isquemia restringido a tejidos es un promotor específico de macrófagos restringido mediante represión.

Preferentemente, el promotor sensible a la isquemia restringido a tejidos es un promotor específico del endotelio.

Preferentemente, el vector retrovítico regulado de la presente invención es un vector retrovítico regulado por ILRE.

5 Preferentemente, el vector retrovítico regulado para su uso de acuerdo con la presente invención es un vector lentivítico regulado por ILRE.

Preferentemente, el vector retrovítico regulado para su uso de acuerdo con la presente invención es un vector lentivítico sensible a la hipoxia autorregulado.

10 Preferentemente, el vector retrovítico regulado para su uso de acuerdo con la presente invención está regulado por la concentración de glucosa.

15 Por ejemplo, las proteínas reguladas por la glucosa (las grp), tales como grp78 y grp94, son proteínas muy conservadas que se sabe que son inducidas por la privación de glucosa (15). El gen de grp 78 se expresa a niveles bajos en la mayoría de los tejidos sanos normales bajo la influencia de elementos promotores de nivel basal, pero tiene al menos dos "elementos reguladores inducibles por estrés" cadena arriba del elemento TATA (15 *ibid*; 16). La unión a una secuencia truncada de 632 pares de bases del extremo 5' del promotor de grp78 confiere una alta capacidad de inducción a la privación de glucosa en genes indicadores *in vitro* (16 *ibid*). Además, esta secuencia

20 promotora de vectores retrovíticos fue capaz de conducir una expresión de alto nivel de un gen indicador en células tumorales de fibrosarcomas murinos, en particular, en sitios relativamente isquémicos/fibróticos centrales (16 *ibid*).

El vector retrovítico regulado para su uso de acuerdo con la presente invención es un vector de autoinactivación (SIN).

25 A modo de ejemplo, se han construido vectores retrovíticos de autoinactivación eliminando los potenciadores de la transcripción o los potenciadores y el promotor en la región U3 de la LTR de 3'. Tras una serie de transcripción inversa e integración del vector, estos cambios se copian en las LTR tanto de 5' como de 3', produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo (17; 18; 19; 20). Sin embargo, cualquier promotor o promotores internos a las LTR en dichos vectores seguirán siendo transcripcionalmente activos. Esta estrategia se ha empleado para eliminar efectos de los potenciadores y promotores en las LTR víricas en la transcripción a partir de genes dispuestos internamente. Dichos efectos incluyen el aumento de la transcripción (21) o la eliminación de la transcripción (22). Esta estrategia también se puede usar para eliminar la transcripción cadena abajo a partir de la LTR de 3' en ADN genómico (23). Esto es de particular importancia en terapia génica humana, en la que es fundamental evitar la activación adventicia

30 de un oncogén endógeno.

Como se ha tratado anteriormente, los vectores retrovíticos de replicación defectuosa se propagan normalmente, por ejemplo, para preparar títulos adecuados del vector retrovítico para la posterior transducción mediante el uso de una combinación de una línea de células de empaquetamiento o de células auxiliares y el vector recombinante. Es decir,

40 que las tres proteínas de empaquetamiento se pueden proporcionar en trans.

En general, una "línea celular de empaquetamiento" contiene uno o más de los genes retrovíticos *gag*, *pol* y *env*. En la presente invención, contiene genes *gag-pol* con codones optimizados, y opcionalmente, un gen *env*. La línea celular de empaquetamiento produce las proteínas necesarias para empaquetar ADN retrovítico, pero no puede producir el encapsidamiento. Convencionalmente, esto se ha logrado a través de la falta de una región *psi*. Sin embargo, cuando un vector recombinante que porta un NOI y una región *psi* se introduce en la línea celular de empaquetamiento, las proteínas auxiliares pueden empaquetar el vector recombinante positivo en *psi* para producir la reserva de virus recombinante. Esta reserva de virus se puede usar para transducir células para introducir el NOI en el genoma de las células diana. Convencionalmente, se ha usado una señal de empaquetamiento *psi*, denominada *psi* plus, que contiene secuencias adicionales que abarcan desde cadena arriba del donante de corte y empalme hasta cadena abajo del codón de inicio de *gag* (24), dado que esto ha mostrado aumentar los títulos víricos.

45

50

El virus recombinante cuyo genoma carece de todos los genes requeridos para obtener proteínas víricas solo se puede transducir una vez, y no se puede propagar. Estos vectores víricos que solo son capaces de una sola serie de transducción de células diana son conocidos como vectores de replicación defectuosa. Por consiguiente, el NOI se introduce en el genoma de la célula hospedadora/diana sin la generación de retrovirus potencialmente nocivos. En Coffin *et al.*, 1997 (*ibid*), se presenta un resumen de las líneas de empaquetamiento disponibles.

55

La línea celular de empaquetamiento retrovítico está preferentemente en forma de una línea celular transfectada transitoriamente. Las transfecciones transitorias se pueden usar ventajosamente para medir niveles de producción del vector cuando se desarrollan vectores. En este sentido, la transfección transitoria evita el tiempo más prolongado requerido para generar líneas celulares productoras de vectores estables, y también se puede usar si el vector o los componentes de empaquetamiento retrovítico son tóxicos para las células. Los componentes usados normalmente para generar vectores retrovíticos incluyen un plásmido que codifica las proteínas *gag-pol*, un plásmido que codifica la proteína *env*, y un plásmido que contiene un NOI. La producción de vectores implica la transfección transitoria de

60

65

uno o más de estos componentes en células que contienen los otros componentes requeridos. Si el vector codifica genes tóxicos o genes que interfieren con la replicación de la célula huésped, tales como inhibidores del ciclo celular o genes que inducen la apoptosis, puede ser difícil generar líneas celulares productoras de vectores estables, pero se puede usar la transfección transitoria para producir el vector antes de que las células mueran. Además, se han desarrollado líneas celulares usando transfección transitoria que produce niveles de títulos de vectores que son comparables a los niveles obtenidos a partir de líneas celulares productoras de vectores estables (25).

Las células productoras/células de empaquetamiento pueden ser cualquier tipo de célula adecuada. En general, las células productoras son células de mamíferos, pero pueden ser, por ejemplo, células de insectos. Una célula productora puede ser una célula de empaquetamiento que contiene los genes estructurales del virus, normalmente integrados en su genoma en el que se introducen los vectores retrovíricos regulados de la presente invención. Como alternativa, la célula productora se puede transfectar con secuencias de ácido nucleico que codifican componentes estructurales, tales como *gag-pol* y *env* con codones optimizados en uno o más vectores tales como plásmidos, vectores de adenovirus, vectores víricos del herpes o cualquier método conocido por suministrar ADN funcional en células diana. Los vectores para su uso de acuerdo con la presente invención se introducen luego en la célula de empaquetamiento mediante los métodos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula productora" o "célula productora de vectores" se refiere a una célula que contiene todos los elementos necesarios para la producción de partículas de vectores retrovíricos regulados y sistemas de suministro retrovílico regulados.

Preferentemente, la célula productora se puede obtener a partir de una línea celular productora estable. Preferentemente, la célula productora se puede obtener a partir de una línea celular productora estable derivada.

Preferentemente, la célula productora se puede obtener a partir de una línea celular productora derivada. Como se usa en el presente documento, la expresión "línea celular productora derivada" es una línea celular productora transducida que se ha explorado y seleccionado para la expresión elevada de un gen marcador. Dichas líneas celulares contienen inserciones retrovíricas en sitios de integración que soportan un alto nivel de expresión a partir del genoma retrovílico. La expresión "línea celular productora derivada" se usa indistintamente con la expresión "línea celular productora estable derivada" y la expresión "línea celular productora estable".

La línea celular productora derivada es una línea celular productora del VIH.

Preferentemente, las secuencias proteicas de la envoltura y las secuencias de las nucleocápsidas se integran todas de forma estable en la célula productora y/o de empaquetamiento. Sin embargo, una o más de estas secuencias también podrían existir en forma episómica, y la expresión génica se podría producir a partir del episoma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula de empaquetamiento" se refiere a una célula que contiene aquellos elementos necesarios para la producción de virus recombinantes infecciosos que están ausentes en un vector vírico recombinante. Por lo general, dichas células de empaquetamiento contienen uno o más vectores que son capaces de expresar proteínas estructurales víricas (tales como *gag-pol* y *env* con codones optimizados), pero no contienen una señal de empaquetamiento.

La expresión "señal de empaquetamiento", que se cita indistintamente como "secuencia de empaquetamiento" o "*psi*" se usa con referencia a la secuencia no codificante, que actúa en *cis*, requerida para el encapsidamiento de hebras de ARN retrovílico durante la formación de las partículas víricas. En VIH-1, esta secuencia se ha cartografiado hasta los locus que se extienden desde cadena arriba del sitio donante (SD) de corte y empalme principal hasta al menos el codón de inicio de *gag*.

Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para su uso con las construcciones vectoriales descritas anteriormente se pueden preparar fácilmente (véase también el documento WO 92/05266), y se utilizan para crear líneas celulares productoras para la producción de partículas de vectores retrovíricos. Como ya se ha mencionado, en "Retroviruses" (1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: J. M. Coffin, S. M. Hughes, H. E. Varmus, pág. 449), se presenta un resumen de las líneas de empaquetamiento disponibles.

También como se ha tratado anteriormente, se ha descubierto que las líneas celulares de empaquetamiento simples, que comprenden un provirus en el que se ha eliminado la señal de empaquetamiento, conducen a la producción rápida de virus competentes para la replicación, no deseados, a través de la recombinación. Para mejorar la seguridad, se han producido líneas celulares de segunda generación, en las que se ha eliminado la LTR de 3' del provirus. En dichas células, serían necesarias dos recombinaciones para producir un virus de tipo silvestre. Una mejora adicional implica la introducción de los genes *gag-pol* y del gen *env* en construcciones separadas, denominadas líneas celulares de empaquetamiento de tercera generación. Estas construcciones se introducen secuencialmente para evitar la recombinación durante la transfección (26; 27),

Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento son líneas celulares de empaquetamiento de segunda generación.

Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento son líneas celulares de empaquetamiento de tercera generación.

En estas líneas celulares de tercera generación, de construcciones divididas, se puede lograr una reducción adicional en la recombinación mediante "el movimiento de codones". Esta técnica, basada en la redundancia del código genético, sirve para reducir la homología entre las construcciones separadas, por ejemplo, entre las regiones de solapamiento en las fases de lectura abiertas de *gag-pol* y *env*.

Las líneas celulares de empaquetamiento son útiles para proporcionar los productos génicos necesarios para encapsidar y proporcionar una proteína de membrana para un vector retrovítico regulado de título elevado y la producción de vehículo de suministro génico nucleico regulado. Cuando se introducen secuencias retrovíticas reguladas en las líneas celulares de empaquetamiento, dichas secuencias se encapsidan con las proteínas de la nucleocápsida (*gag-pol*), y estas unidades brotan entonces a través de la membrana celular para rodearse en la membrana celular y contener la proteína de la envoltura producida en la línea celular de empaquetamiento. Estos retrovirus regulados infecciosos son útiles como unidades infecciosas en sí o como vectores de suministro de genes.

La célula de empaquetamiento puede ser una célula cultivada *in vitro*, tal como una línea celular de cultivo de tejidos. Las líneas celulares adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de mamíferos tales como líneas celulares derivadas de fibroblastos murinos o líneas celulares humanas. Preferentemente, la línea celular de empaquetamiento es una línea celular humana tal como, por ejemplo: HEK293, 293-T, TE671, HT1080.

Como alternativa, la célula de empaquetamiento puede ser una célula derivada del individuo que se va a tratar, tal como un monocito, macrófago, glóbulo rojo o fibroblasto. La célula se puede aislar de un individuo, y los componentes de empaquetamiento y del vector administrase *ex vivo* tras lo que se vuelven a administrar las células de empaquetamiento autólogas.

Es muy deseable usar preparaciones víricas de título elevado en aplicaciones tanto experimentales como prácticas. Las técnicas para aumentar el título vírico incluyen el uso de una señal de empaquetamiento *psi* plus, como se ha descrito anteriormente, y la concentración de reservas víricas. Además, el uso de diferentes proteínas de la envoltura, tales como la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, ha mejorado los títulos tras la concentración hasta 10^9 por ml (28). Sin embargo, normalmente, la proteína de la envoltura se escogerá de forma que la partícula vírica infectará preferentemente células que estén infectadas con el virus que se desea tratar. Por ejemplo, cuando se esté usando un vector de VIH para tratar la infección por VIH, la proteína *env* usada será la proteína *env* del VIH.

El proceso de producción de un vector retrovítico en el que la proteína de envoltura no es la envoltura nativa del retrovirus se conoce como "pseudotipificación". Ciertas proteínas de envoltura, tales como la proteína de envoltura de MLV y la proteína del virus G de la estomatitis vesicular (VSV-G), pseudotipifican retrovirus muy bien. La pseudotipificación no es un nuevo fenómeno, y los ejemplos se pueden encontrar en los documentos WO-A-98/05759, WO-A-98/05754, WO-A-97/17457, WO-A-96/09400, WO-A-91/00047 y (29).

Como se usa en el presente documento, la expresión "título elevado" significa una cantidad eficaz de un vector retrovítico o partícula retrovítica que es capaz de transducir un sitio diana tal como una célula.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad de un vector retrovítico o lentivítico regulado, o partícula vectorial, que es suficiente para inducir la expresión de un NOI en un sitio diana.

Preferentemente, el título es de al menos 10^6 partículas retrovíticas por ml, tal como de 10^6 a 10^7 por ml, más preferentemente al menos 10^7 partículas de retrovirus por ml.

De acuerdo con la presente invención, es posible manipular el genoma vírico o la secuencia nucleotídica del vector retrovítico regulado de forma que los genes víricos se reemplacen o complementen con uno o más NOI que pueden ser NOI heterólogos.

El término "heterólogo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico o secuencia proteica ligada a una secuencia de ácido nucleico o de proteína que no está enlazada de forma natural.

Con la presente invención, el término NOI (es decir, secuencia nucleotídica de interés) incluye cualquier secuencia nucleotídica adecuada, que no necesariamente necesita ser una secuencia de ADN de origen natural completa. Por lo tanto, la secuencia de ADN puede ser, por ejemplo, una secuencia de ADN sintético, una secuencia de ADN recombinante (es decir, preparada mediante el uso de técnicas de ADN recombinante), una secuencia de ADNc o una secuencia de ADN genómico parcial, incluyendo sus combinaciones. No es necesario que la secuencia de ADN sea una región codificante. Si es una región codificante, no es necesario que sea una región codificante entera. Además, la secuencia de ADN puede estar en una orientación sentido o en una orientación antisentido. Preferentemente, está en una orientación sentido. Preferentemente, el ADN es o comprende ADNc.

El o los NOI pueden ser uno cualquiera o más de gen/es de selección, gen/es marcadores y gen/es terapéutico/s.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de selección" se refiere al uso de un NOI que codifica un marcador seleccionable que puede tener una actividad enzimática que confiere resistencia a un antibiótico o fármaco a la célula en la que se expresa el marcador seleccionable.

Se han usado muchos marcadores seleccionables diferentes con éxito en vectores retrovéricos. Estos se revisan en "Retroviruses" (1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: J. M. Coffin, S. M. Hughes, H. E. Varmus pág. 444), e incluyen, pero sin limitación, los genes bacterianos de neomicina (neo) e higromicina fosfotransferasa, que confieren resistencia a G418 y a la higromicina respectivamente; un gen de dihidrofolato reductasa de ratón mutante, que confiere resistencia al metotrexato, el gen de *gpt* bacteriano, que permite a las células crecer en medio que contiene ácido micofenólico, xantina y aminopterina; el gen *hisD* bacteriano, que permite a las células crecer en medio sin histidina, pero que contiene histidinol; el gen de resistencia a múltiples fármacos (*mdr*), que confiere resistencia a una variedad de fármacos; y los genes bacterianos que confieren resistencia a la puomicina o la fleomicina. Todos estos marcadores son seleccionables dominantes, y permiten la selección química de la mayoría de las células que expresan estos genes. Otros marcadores seleccionables no son dominantes, por lo que su uso se debe de hacer conjuntamente con una línea celular que carezca de la actividad enzimática pertinente. Los ejemplos de marcadores seleccionables no dominantes incluyen el gen de timidina quinasa (*tk*), que se usa junto con líneas celulares de *tk*.

Los marcadores particularmente preferidos son la blasticidina y la neomicina, opcionalmente, unidas de forma operativa a una secuencia codificante de timidina quinasa normalmente bajo el control de la transcripción de un fuerte promotor vírico tal como el promotor SV40.

De acuerdo con la presente invención, las secuencias de NOI adecuadas incluyen aquellas que son de aplicación terapéutica y/o diagnóstica tales como, pero sin limitación: secuencias que codifican citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas similares a las inmunoglobulinas manipuladas por ingeniería, un anticuerpo monocatenario, proteínas de fusión, enzimas, moléculas coestimulantes inmunitarias, moléculas inmunomoduladoras, ARN antisentido, un mutante negativo transdominante de una proteína diana, una toxina, una toxina condicional, un antígeno, una proteína y factores de crecimiento supresores de tumores, proteínas de la membrana, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas y ribozimas antiviricas, y derivados de los mismos (tales como con un grupo indicador asociado). Cuando se incluyen, normalmente, dichas secuencias codificantes pueden estar unidas de forma operativa a un promotor adecuado, que puede ser un promotor que conduzca la expresión de una o varias ribozimas, o uno o varios promotores diferentes, tal como en uno o más tipos de células específicos.

Los NOI adecuados para su uso en la invención en el tratamiento o la profilaxis del cáncer incluyen los NOI que codifican proteínas que: destruyen la célula diana (por ejemplo, una toxina ribosómica), actúan como: supresores tumorales (tales como p53 de tipo silvestre); activadores de mecanismos inmunitarios antitumorales (tales como citocinas, moléculas coestimulantes e inmunoglobulinas); inhibidores de la angiogénesis; o que proporcionan sensibilidad potenciada a fármacos (tales como enzimas de activación de profármacos); estimulan indirectamente la destrucción de la célula diana por células efectoras naturales (por ejemplo, un potente antígeno para estimular el sistema inmunitario o convertir una sustancia precursora en una sustancia tóxica que destruya la célula diana (por ejemplo, una enzima activadora de profármacos).

Los ejemplos de profármacos incluyen, pero sin limitación, fosfato de etopósido (usado con fosfatasa alcalina; 5-fluorocitosina (con citosina desaminasa); doxorrubin-N-p-hidroxifenoxiacetamida (con penicilin-V-amidasa); glutamato de para-N-bis(2-cloroetil)aminobenzoílo (con carboxipeptidasa G2); carbamatos de mostaza de nitrógeno de cefalosporina (con B-lactamasa); SR4233 (con p450 reductasa); ganciclovir (con HSV timidina quinasa); profármacos de mostaza con nitrorreductasa y ciclofosfamida o ifosfamida (con citocromo p450).

Los NOI adecuados para su uso en el tratamiento o en la prevención de la enfermedad cardíaca isquémica incluyen los NOI que codifican activadores del plasminógeno. Los NOI adecuados para el tratamiento o la prevención de la artritis reumatoide o la malaria cerebral incluyen genes que codifican proteínas antiinflamatorias, anticuerpos dirigidos contra el factor alfa de necrosis tumoral (TNF) y moléculas antiadhesión (tales como moléculas de anticuerpos o receptores específicos para moléculas de adhesión).

Los productos de expresión codificados por los NOI pueden ser proteínas que se segregan a partir de la célula. Como alternativa, los productos de expresión de los NOI no se segregan y son activos en la célula. En cualquier caso, se prefiere que el producto de expresión de los NOI demuestre un efecto espectador o un efecto espectador distante; es decir, la producción del producto de expresión en una célula que conduce a la destrucción de células relacionadas, adicionales, bien circundantes o distantes (por ejemplo, metastásicas), que poseen un fenotipo común. Las proteínas codificadas también podrían destruir células tumorales espectadoras (por ejemplo, con proteína de fusión de anticuerpo antitumoral-toxina ribosómica segregada), indirectamente podrían estimular la destrucción de células tumorales espectadoras (por ejemplo, citocinas para estimular el sistema inmunitario o proteínas procoagulantes causantes de la oclusión vascular local) o convertir una sustancia precursora en una sustancia tóxica que destruya células tumorales espectadoras (por ejemplo, una enzima que active un profármaco en un fármaco difusible). También, el suministro de NOI que codifican transcripciones antisentido o ribozimas que interfieren con la expresión de genes celulares para la persistencia tumoral (por ejemplo, contra transcripciones de *myc* aberrantes en

linfoma de Burkitts o contra transcripciones de *bcr-abl* en leucemia mieloide crónica. También se prevé el uso de combinaciones de dichos NOI.

El/los NOI para su uso en la presente invención también pueden comprender uno o más NOI codificantes de citocinas. Las citocinas y los factores de crecimiento adecuados incluyen, pero sin limitación: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento fibroblástico 10 (30), el ligando FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, insulina, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aminoácidos), IL-8 (77 aminoácidos), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α, Inhibina β, IP-10, factor 2 de crecimiento de queratinocitos (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora Mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína que atrae a monocitos (30 *ibid*), M-CSF, MDC (67 aminoácidos), MDC (69 aminoácidos), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 aminoácidos), MDC (69 aminoácidos), MIG, MIP-1α, MEP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, factor-1 inhibidor del progenitor de mieloide (MIPF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento de nervios, β-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF-α, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF-α, TNF-β, TNIL-1, TPO, VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCC1, 1-309.

El/los NOI pueden estar bajo el control de expresión de un elemento regulador de la expresión, tal como un promotor y/o un potenciador promotor conocido como "elementos sensibles".

Cuando las partículas del vector retrovítico regulado se usan para transferir los NOI a células que transducen, dichas partículas vectoriales también se denominan "sistemas de suministro vírico" o "sistemas de suministro retrovítico". Los vectores víricos, incluyendo los vectores retrovíticos, se han usado para transferir NOI eficientemente aprovechando el proceso de transducción vírica. Los NOI clonados en el genoma retrovítico se pueden suministrar eficazmente a células susceptibles a la transducción mediante un retrovirus. A través de otras manipulaciones genéticas, se puede destruir la capacidad de replicación del genoma retrovítico. Los vectores introducen nuevo material genético en una célula, pero son incapaces de replicarse.

El vector retrovítico regulado para su uso de acuerdo con la presente invención se puede suministrar mediante técnicas víricas o no víricas. Los sistemas de suministro no vírico incluyen, pero sin limitación, métodos de transfección de ADN. En el presente documento, la transfección incluye un proceso que usa un vector no vírico para suministrar un gen a una célula de mamífero diana.

Los métodos de transfección típicos incluyen electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, mediación por agentes catiónicos, anfililos faciales catiónicos (CFA) (31), cationes multivalentes tales como espermina, lípidos catiónicos o polilisina, complejos de 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP)-colesterol (32) y combinaciones de los mismos.

Los sistemas de suministro vírico incluyen, pero sin limitación, vector adenovírico, un vector vírico adenoasociado (AAV), un vector vírico del herpes, un vector retrovítico, un vector lentivírico o un vector baculovírico. Estos sistemas de suministro vírico se pueden configurar como un vector de intrón dividido. En el documento WO 99/15653, se describe un vector de intrón dividido.

Otros ejemplos de vectores incluyen sistemas de suministro *ex vivo*, que incluyen, pero sin limitación, métodos de transfección de ADN tales como electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado.

El vector puede ser un vector de ADN plasmídico. Como alternativa, el vector puede ser un vector vírico recombinante. Los vectores víricos recombinantes adecuados incluyen vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores del virus del herpes, o vectores retrovíticos, vectores lentivíricos o una combinación de vectores adenovíricos y lentivíricos. En el caso de los vectores víricos, el suministro génico está mediado por la infección vírica de una célula diana.

Si se combinan las características de los adenovirus con la estabilidad genética de los retro/lentivirus, entonces, esencialmente, el adenovirus se puede usar para transducir células diana para que se conviertan en células productoras retrovíticas transitorias que podrían infectar de forma estable a las células vecinas.

También se desvela una composición farmacéutica para tratar un individuo mediante terapia génica, en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector retrovítico regulado según lo descrito. La composición farmacéutica puede ser para uso humano o animal. Por lo general, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un individuo, y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular.

La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede realizar con respecto a la vía deseada de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden

comprender como el - o además de - vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante/s, lubricante/s, agente/s de suspensión, agente/s de recubrimiento, agente/s solubilizante/s y otros agentes vehículo adecuados que puedan ayudar o aumentar la entrada vírica en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de suministro de lípidos).

5 Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante una o más de: minibombas, inhalación, en forma de un supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo de uso externo, mediante uso de un parche cutáneo; por vía oral en forma de comprimidos
10 que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos bien solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o se pueden inyectar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden usar mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para volver la solución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones se pueden administrar en
15 forma de comprimidos o grageas que se pueden formular de manera convencional.

Se cree que la presente invención tiene una aplicabilidad terapéutica amplia - dependiendo, entre otros, de la selección del uno o más NOI.

Por ejemplo, la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/05635. Para facilitar la referencia, a continuación, se proporciona parte de esa lista: cáncer, inflamación o
20 enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase agua, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de choque, reacciones de injerto contra hospedador, enfermedad autoinmunitaria, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de la aspirina; crecimiento, invasión y propagación tumoral; angiogénesis, metástasis, tumor maligno,
25 ascitis y efusión pleural maligna; isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica, artrosis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, apoplejía, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; soriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermolisis ampollosa, ulceración córnea, retinopatía y curación de heridas quirúrgicas, rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anafilaxis; reestenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis,
30 aterosclerosis o endosclerosis.

Además, o como alternativa, la presente invención puede ser útil en el tratamiento de trastornos enumerados en el documento WO-A-98/07859. Para facilitar la referencia, a continuación, se proporciona parte de esa lista: actividad de proliferación/diferenciación de células y citocinas; actividad inmunosupresora o inmunoestimulante (por ejemplo,
35 para tratar la deficiencia inmunitaria, incluyendo la infección con un virus de inmunodeficiencia humana; la regulación del crecimiento linfocítico; para tratar el cáncer y muchas enfermedades autoinmunitarias, y para prevenir el rechazo de trasplantes o inducir la inmunidad tumoral); la regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides; la potenciación del crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamento y tejido nervioso, por ejemplo, para cicatrizar heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y
40 neurodegeneración; la inhibición o activación de la hormona estimulante de folículos (modulación de la fertilidad); la actividad quimiotáctica/quimiocinética (por ejemplo, para movilizar tipos de células específicos en sitios de lesión o infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo, para tratar la hemofilia y la apoplejía); actividad antiinflamatoria (para tratar, por ejemplo, el choque séptico o la enfermedad de Crohn); como antimicrobianos; moduladores de, por ejemplo, el metabolismo o comportamiento; como analgésicos; para tratar trastornos de
45 deficiencia específicos; en el tratamiento de, por ejemplo, la soriasis, en medicina humana o veterinaria.

Además, o como alternativa, la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/09985. Para facilitar la referencia, a continuación, se proporciona parte de esa lista: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de linfocitos T y, por tanto, actividad antiinflamatoria; actividad
50 antiinflamatoria, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con la inflamación; inhibir la capacidad de los macrófagos y los linfocitos T para adherirse a componentes de la matriz extracelular y a la fibronectina, así como expresión del receptor fas regulada positivamente en los linfocitos T; inhibir la reacción inmunitaria no deseada y la inflamación, incluyendo la artritis, incluyendo la artritis reumatoide, inflamación asociada con la hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus
55 eritematoso sistémico, enfermedades de colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada con aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, parada cardíaca, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome disneico u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con la úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tubo digestivo, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares,
60 glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, orquitis o epididimo-orquitis, infertilidad, traumatismo testicular u otras enfermedades testiculares relacionadas con el sistema inmunitario, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto recidivante, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas relacionadas con el sistema inmunitario y/o relacionadas con la inflamación, uveítis
65 posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentosa,

componentes inmunitarios e inflamatorios de enfermedad del fondo degenerativa, componentes inflamatorios de traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo, tras la operación de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o de inflamación contra implantes oculares, y otras enfermedades oftálmicas relacionadas con el sistema inmunitario y relacionadas con la inflamación, inflamación asociada con enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunitarios en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, sería beneficiosa la eliminación inmunitaria y/o de la inflamación, enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios debidos al tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionada con el SIDA, encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades degenerativas, afecciones o trastornos del SNC, componentes inflamatorios de apoplejías, síndrome posterior a la polio, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomiелitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, pseudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares, enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y relacionadas con la inflamación, afecciones o trastornos de los sistemas nerviosos central y periférico, inflamación post-traumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones inflamatorias y/o inmunitarias y efectos secundarios de la terapia génica, por ejemplo, debido a infección con un vehículo vírico o inflamación asociada con el SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo, leucemia, reduciendo la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o el tratamiento de rechazo de injerto en los casos de trasplante de células, tejido y órganos naturales o artificiales, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial.

A continuación, se describirá la invención adicionalmente por medio de ejemplos que pretenden servir para ayudar al experto en la materia a llevar a cabo la invención, y no pretenden, bajo ningún concepto, ser limitantes del alcance de la invención. Los ejemplos se refieren a las figuras. En las figuras:

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra esquemáticamente cómo crear una LTR de 3' adecuada mediante PCR;

la Figura 2 muestra la tabla de uso de codones para *gag-pol* del VIH de tipo silvestre de la cepa HXB2 (número de acceso: K03455);

la Figura 3a muestra la tabla de uso de codones de la secuencia con codones optimizados denominada gagpol-SYNgp. La Figura 3b muestra una tabla de uso de codones comparativa;

la Figura 4 muestra la tabla de uso de codones del *env* del VIH de tipo silvestre denominado *env-mn*;

la Figura 5 muestra la tabla de uso de codones de la secuencia con codones optimizados de *env* del VIH denominada SYNgp160mm;

la Figura 6 muestra dos construcciones plasmídicas para su uso en la invención;

la Figura 7 muestra el principio que hay tras dos sistemas de producción de partículas de vector retrovítico;

la Figura 8 muestra una comparación de secuencias entre la secuencia de *gag-pol* del VIH de tipo silvestre (pGP-RRE3) y la secuencia de *gag-pol* con codones optimizados (pSYNGP);

la Figura 9 muestra una comparación de secuencias entre la secuencia de *gag-pol* de EIAV de tipo silvestre (WT) y la secuencia de *gag-pol* con codones optimizados (CO);

la Figura 10 muestra la independencia de Rev de la formación de partículas de expresión de proteína;

la Figura 11 muestra las velocidades de traducción de *gag-pol* de tipo silvestre (WT) y con codones optimizados;

la Figura 12 muestra los niveles de ARNm de *gag-pol* en fracciones totales y citoplásmicas;

la Figura 13 muestra el efecto de la inserción de *gag* de WT cadena abajo del gen con codones optimizados sobre los niveles de ARN y de proteína;

la Figura 14 muestra los plásmidos usados para estudiar el efecto de *gag* de VIH-1 sobre el gen con codones optimizados;

la Figura 15 muestra el efecto sobre el ARN citoplásmico de la inserción de *gag* del VIH-1 cadena arriba del gen

con codones optimizados;

la Figura 16 muestra el efecto de Leptomicina B (LMB) sobre la producción de proteína;

5 la Figura 17 muestra los niveles de ARN citoplásmico de los genomas del vector;

la Figura 18 muestra la eficiencia de la transducción a MOI1;

10 la Figura 19 muestra una representación esquemática de pGP-RRE3;

la Figura 20 muestra una representación esquemática de pSYNGP;

la Figura 21 muestra títulos del vector generados con diferentes construcciones de *gag-pol*;

15 la Figura 22 muestra títulos del vector a partir de los genomas Rev/RRE (-) y (+);

la Figura 23 muestra títulos del vector a partir de la serie pHS de genomas del vector;

20 la Figura 24 muestra títulos del vector para la serie de pHS de genomas del vector en presencia o ausencia de Rev/RRE;

la Figura 25 muestra un análisis de las construcciones de *gag-pol*;

25 la Figura 26 muestra una transferencia Western de extractos de 293T;

la Figura 27 es una representación esquemática de pESYNGP;

la Figura 28 es una representación esquemática de LpESYNGP;

30 la Figura 29 es una representación esquemática de LpESYNGPRRE;

la Figura 30 es una representación esquemática de pESYNGPRRE;

35 la Figura 31 es una representación esquemática de pONY4.0Z;

la Figura 32 es una representación esquemática de pONY8.0Z;

la Figura 33 es una representación esquemática de pONY8.1Z;

40 la Figura 34 es una representación esquemática de pONY3.1;

la Figura 35 es una representación esquemática de pCIneoERev;

45 la Figura 36 es una representación esquemática de pESYNREV;

las Figuras 37 y 38 muestran el efecto de diferentes construcciones vectoriales sobre los títulos de vectores víricos;

50 las Figuras 39 y 40 muestran el efecto de diferentes construcciones vectoriales sobre la actividad de RT;

la Figura 41 muestra el efecto de la secuencia líder de 5' en el título del vector vírico;

la Figura 42 muestra títulos del vector vírico cuando se usa pONY8.1Z;

55 la Figura 43 muestra una comparación entre las secuencias de pONY3.1 y pONY3.2OPTI con codones optimizados en los primeros 372 nucleótidos de *gag*;

la Figura 44 es una representación esquemática de pIRES1hygESYNGP;

60 las Figuras 45 y 46 muestran los resultados de experimentos para confirmar que *gag-pol* con codones optimizados se puede usar en la producción de líneas celulares de empaquetamiento y productoras;

las Figuras 47 y 48 muestran los resultados de experimentos que confirman que el ARN procedente de *gag-pol* con codones optimizados está empaquetado menos eficazmente que el del gen de tipo silvestre;

65 la Figura 49 muestra los resultados de un experimento que confirma que la expresión de pESYNGP y

pESDSYNGP son similares;

la Figura 50 es una representación esquemática de pESDSYNGP; y

5 la Figura 51 muestra los resultados de un experimento que confirma que la eficiencia de encapsidar ARN de *gag-pol* en células PEV-17 y células B-241 es similar.

En más detalle, la Figura 8 muestra una comparación de secuencias entre la secuencia de *gag-pol* del VIH de tipo silvestre (pGP-RRE3) y la secuencia de *gag-pol* con codones optimizados (pSYNGP), en la que la secuencia superior representa pSYNGP y la secuencia inferior representa pGP-RRE3.

La Figura 10 muestra la independencia de Rev de la formación de partículas para la expresión de proteínas. Se transfectaron 5 µg de los plásmidos de expresión de *gag-pol* en células 293T en presencia o ausencia de Rev (pCMV-Rev, 1 µg), y se determinaron los niveles de proteína 48 horas después de la transfección en sobrenadantes de cultivo (A) y lisados celulares (B). Para detectar las proteínas *gag-pol*, se usó suero humano positivo en VIH-1. Las transferencias se volvieron a sonar con un anticuerpo anti-actina, como control interno (C). Los tamaños (en kDa) de los marcadores proteicos (New England Biolabs) se muestran al lado del gel. Carriles: 1. células 293T transfectadas simuladamente, 2. pGP-RRE3, 3. pGP-RRE3 + pCMV-Rev, 4. pSYNGP, 5. pSYNGP + pCMV-Rev, 6. pSYNGP-RRE, 7. pSYNGP-RRE + pCMV-Rev, 8. pSYNGP-ERR, 9. pSYNGP-ERR + pCMV-Rev.

La Figura 11 muestra las velocidades de traducción de *gag-pol* de WT y con codones optimizados. Se transfectaron células 293T con 2 µg de pGP-RRE3 (± 1 µg de pCMV-Rev) o 2 µg de pSYNGP. Las muestras de proteínas de sobrenadantes de cultivo (A) y de extractos celulares (B) se analizaron mediante transferencia Western 12, 25, 37 y 48 horas después de la transfección. Para detectar las proteínas *gag-pol* (A, B), se usó suero humano positivo en VIH-1, y como control interno (C), se usó un anticuerpo anti-actina. Los tamaños de los marcadores proteicos se muestran al lado del gel (en kD). Se usó un Phosphorimager para la cuantificación de los resultados. Carriles: 1. pGP-RRE3 12 h, 2. pGP-RRE3 25 h, 3. pGP-RRE3 37 h, 4. pGP-RRE3 48 h, 5. pGP-RRE3 + pCMV-Rev 12 h, 6. pGP-RRE3 + pCMV-Rev 25 h, 7. pGP-RRE3 + pCMV-Rev 37 h, 8. pGP-RRE3 + pCMV-Rev 48 h, 9. pSYNGP 12 h, 10. pSYNGP 25 h, 11. pSYNGP 37 h, 12. pSYNGP 48 h, 13. células 293T transfectadas simuladamente.

La Figura 12 muestra los niveles de ARNm de *gag-pol* en fracciones totales y citoplásmicas. Se extrajo el ARN total y citoplásmico de células 293T 36 horas después de la transfección con 5 µg del plásmido de expresión de *gag-pol* (± 1 µg de pCMV-Rev), y se estimaron los niveles de ARNm mediante análisis de transferencia Northern. Se usó una sonda complementaria a los nucleótidos 1222-1503 de tanto el gen de tipo silvestre como el gen con codones optimizados. El panel A muestra la banda que corresponde a la *gag-pol* del VIH-1. Los tamaños de los ARNm son de 4,4 kb para el gen con codones optimizados, y de 6 kb para el gen de tipo silvestre. El panel B muestra la banda que corresponde a ubiquitina humana (control interno para la normalización de los resultados). La cuantificación se realizó usando un Phosphorimager. Numeración de los carriles: c indica fracción citoplásmica y t indica fracción de ARN total. Carriles: 1. pGP-RRE3, 2. pGP-RRE3 + pCMV-Rev, 3. pSYNGP, 4. pSYNGP + pCMV-Rev, 5. pSYNGP-RRE, 6. pSYNGP-RRE + pCMV-Rev, 7. células 293T transfectadas simuladamente, 8. pGP-RRE3 + pCMV-Rev, 9. células 293T transfectadas 65 simuladamente, 10. pSYNGP.

La Figura 13 muestra el efecto de la inserción de *gag* de WT cadena abajo del gen con codones optimizados sobre los niveles de ARN y de proteína. La secuencia de *gag* de WT se insertó cadena abajo del gen con codones optimizados en ambas orientaciones (sitio *NotI*), dando como resultado los plásmidos pSYN6 (orientación correcta, véase la Figura 14) y pSYN7 (orientación inversa, véase la Figura 14). También se insertó el gen codificante de β-galactosidasa (LacZ) en el mismo sitio y en la orientación correcta (plásmido pSYN8, véase la Figura 14). Se transfectaron células 293T con 5 µg de cada plásmido, y 48 horas después de la transfección, se determinaron los niveles de ARNm y de proteína como se ha descrito previamente, por medio de análisis de transferencia Northern y Western.

Análisis de transferencia Northern en fracciones de ARN citoplásmico. Se sondó la transferencia con una sonda complementaria a los nucleótidos 1510-2290 del gen con codones optimizados (I), y se volvió a sonar con una sonda específica para la ubiquitina humana (II). Carriles: 1. pSYNGP, 2. pSYN8, 3. pSYN7, 4. pSYN6. Análisis de transferencia Western: se usó suero humano positivo en VIH-1 para detectar las proteínas *gag-pol* (I), y como control interno, se usó un anticuerpo anti-actina (II). Carriles: lisados celulares: 1. células 293T transfectadas simuladamente, 2. pGP-RRE3 + pCMV-Rev, 3. pSYNGP, 4. pSYN6, 5. pSYN7, 6. pSYN8. Sobrenadantes: 7. células 293T transfectadas simuladamente, 8. pGP-RRE3 + pCMV-Rev, 9. pSYNGP, 10. pSYN6, 11. pSYN7, 12. pSYN8. Los tamaños de los marcadores proteicos (New England Biolabs) se muestran al lado del gel.

La Figura 14 muestra los plásmidos usados para estudiar el efecto de *gag* del VIH-1 sobre el gen con codones optimizados. La estructura principal para todas las construcciones fue pCI-Neo. Syn gp: el gen *gag-pol* del VIH-1 con codones optimizados. HXB2 *gag*: el gen *gag* del VIH-1 de tipo silvestre. HXB2 *gag*: el gen *gag* del VIH-1 de tipo silvestre en la orientación inversa. HXB2 *gag*ΔATG: el gen *gag* del VIH-1 de tipo silvestre sin el ATG de *gag*. HXB2 *gag*-fr.sh.: el gen *gag* de VIH-1 de tipo silvestre con una mutación de desplazamiento de fase. HXB2 *gag* 625-1503:

nucleótidos 625-1503 del gen *gag* del VIH-1 de tipo silvestre. HXB2 *gag* 1-625: nucleótidos 1-625 del gen *gag* del VIH-1 de tipo silvestre.

La Figura 15 muestra el efecto sobre el ARN citoplásmico de la inserción de *gag* del VIH-1 cadena arriba del gen con codones optimizados. Se extrajo ARN citoplásmico 48 horas después de la transfección de células 293T (se usaron 5 µg de cada plásmido pSYN, y en algunos casos se cotransfectó 1 µg de pCMV-Rev). La sonda que se usó se diseñó para que fuera complementaria a los nucleótidos 1510-2290 del gen con codones optimizados (I). Como control interno, se usó una sonda específica para ubiquitina humana (II). Carriles: 1. pSYNGP, 2. pSYN9, 3. pSYN10, 4. pSYN10 + pCMV-Rev, 5. pSYN11, 6. pSYN11 + pCMV-Rev, 7. pCMV-Rev. Carriles: 1. pSYNGP, 2. pSYNGP-RRE, 3. pSYNGP-RRE + pCMV-Rev, 4. pSYN12, 5. pSYN14, 6. pSYN14 + pCMV-Rev, 7. pSYN13, 8. pSYN15, 9. pSYN17, 10. pGP-RRE3, 11. pSYN6, 12. pSYN9, 13. pCMV-Rev.

La Figura 16 muestra el efecto de LMB sobre la producción de proteínas. Se transfectaron células 293T con 1 µg de pCMV-Rev y 3 µg de pGP-RRE3/pSYNGP/pSYNGP-RRE (\pm 1 µg de pCMV-Rev). Las transfecciones se hicieron por duplicado. 5 horas después de la transfección, se reemplazó el medio por medio recién preparado en el primer conjunto y con medio recién preparado que contenía LMB 7,5 nM en el segundo. 20 horas más tarde, se sometieron las células a lisis, y se estimó la producción de proteína mediante análisis de transferencia Western. Para detectar las proteínas *gag-pol*, se usó suero humano positivo en VIH-1 (A) y, como control interno, se usó un anticuerpo anti-actina (B). Carriles: 1. pGP-RRE3, 2. pGP-RRE3 + LMB, 3. pGP-RRE3 + pCMV-Rev, 4. pGP-RRE3 + pCMV-Rev + LMB, 5. pSYNGP, 6. pSYNGP + LMB, 7. pSYNGP + pCMV-Rev, 8. pSYNGP + pCMV-Rev + LMB, 9. pSYNGP-RRE, 10. pSYNGP-RRE + LMB, 11. pSYNGP-RRE + pCMV-Rev, 12. pSYNGP-RRE + pCMV-Rev + LMB.

La Figura 17 muestra los niveles de ARN citoplásmico de los genomas de los vectores. Se transfectaron células 293T con 10 µg de cada genoma vectorial. Se extrajo ARN citoplásmico 48 horas después de la transfección. Se usaron 20 µg de ARN de cada muestra para análisis de transferencia Northern. Se diseñó la sonda de 700 pb para que se hibridara a todos los ARN de los genomas vectoriales (véase Materiales y Métodos). Carriles: 1. pH6nZ, 2. pH6nZ + pCMV-Rev, 3. pH6.1nZ, 4. pH6.1nZ + pCMV-Rev, 5. pHS1nZ, 6. pHS2nZ, 7. pHS3nZ, 8. pHS4nZ, 9. pHS5nZ, 10. pHS6nZ, 11. pHS7nZ, 12. pHS8nZ, 13. pCMV-Rev.

La Figura 18 muestra la eficiencia de la transducción a una mdi de 1. Se generaron reservas víricas mediante cotransfección de cada plásmido de expresión de *gag-pol* (5 o 0,5 µg), 15 µg de pH6nZ o pHS3nZ (plásmido de genoma vectorial) y 5 µg de pHCMVG (plásmido de la expresión de la envoltura de VSV), en células 293T. El virus se concentró como se ha descrito previamente (45), y se determinó la eficiencia de la transducción a una mdi de 0,01-1 en células HT1080. Hubo una correlación lineal de la eficiencia de la transducción y la mdi en todos los casos. En el presente documento se muestra una imagen representativa a una mdi de 1. La eficiencia de la transducción fue >80 % con cualquier genoma, cualquier *gag-pol* y cualquier cantidad alta o baja de pSYNGP. Los títulos antes de la concentración (UI./ml): en células 293T: A. $6,6 \times 10^5$, B. $7,6 \times 10^5$, C. $9,2 \times 10^5$, D. $1,5 \times 10^5$, en células HT1080: A. $6,0 \times 10^4$, B. $9,9 \times 10^4$, C. $8,0 \times 10^4$, D. $2,9 \times 10^4$. Títulos después de la concentración (UI./ml) en células HT1080: A. $6,0 \times 10^5$, B. $2,0 \times 10^6$, C. $1,4 \times 10^6$, D. $2,0 \times 10^5$.

La Figura 21 muestra títulos de vectores obtenidos con diferentes construcciones de *gag-pol*. Se generaron reservas víricas mediante cotransfección de cada plásmido de expresión de *gag-pol*, pH6nZ (plásmido de genoma vectorial) y pHCMVG (plásmido de la expresión de la envoltura de VSV, 2,5 µg para cada transfección), en células 293T. Se midieron los títulos (UI./ml de reserva vírica) en células 293T contando el número de colonias azules tras la tinción con X-Gal 48 horas después de la transducción. Se realizaron experimentos al menos dos veces, y la variación entre los experimentos fue inferior al 15 %.

La Figura 22 muestra títulos de vectores a partir de los genomas Rev/RRE (-) y (+): los vectores retrovíricos se generaron como se describe en los ejemplos. Se determinaron los títulos (UI/ml de reserva vírica + SD) en células 293T.

La Figura 23 muestra títulos de vectores a partir de las series de pHS de genomas vectoriales. El vector retrovírico se generó como se describe en los ejemplos. Se determinaron los títulos (UI/ml de reserva vírica + SD) en células 293T. Rev se proporciona a partir de pCMV-Rev. Cabe señalar que pH6nZ expresa Rev y contiene el RRE. Ninguno de los otros genomas expresa Rev ni contiene el RRE. La expresión de pSYNGP es independiente de Rev, mientras que es dependiente de Rev para pGP-RRE3.

La Figura 24 muestra títulos de vectores para la serie de pHS de genomas vectoriales en presencia o ausencia de Rev/RRE. El vector retrovírico se generó como se describe en los ejemplos. Se usaron 5 µg de genoma vectorial, 5 µg de pSYNGP y 2,5 µg de pHCMVG, y los títulos (UI/ml) se determinaron en células 293T. Los experimentos se realizaron al menos dos veces, y la variación entre experimentos fue inferior al 15 %. Rev se proporciona a partir de pCMV-Rev (1 µg). Cabe señalar que pH6nZ expresa Rev y contiene el RRE. Ninguno de los genomas de pHS expresa Rev, y solo pHS1nZR, pHS3nZR, pHS7nZR y pH6.1nZR contienen el RRE. La expresión de *gag-pol* a partir de pSYNGP es independiente de Rev.

La Figura 26 muestra una transferencia Western de extractos de 293T, en los que se separaron 30 g de proteína celular total mediante electroforesis de SDS/PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpos anti-EIAV. El anticuerpo secundario fue anti-HRP de caballo (Sigma).

- 5 En la Figura 38, los títulos se muestran en unidades formadoras de lacZ (UFL)/ml. Los vectores usados se indican en recuadros encima de las barras.

Para facilitar la referencia, también se exponen las secuencias enumeradas en el listado de secuencia que se adjunta:

- 10 SEC ID NO: 1 muestra la secuencia de la secuencia de *gag-pol* de tipo silvestre para la cepa HXB2 (número de acceso K03455);
 SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de pSYNGP;
 15 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia del gen de la envoltura para MN VIH-1 (número de acceso del GenBank M17449);
 SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de SYNGp-160mn - secuencia de *env* con codones optimizados;
 SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de pESYNGP;
 SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de LpESYNGP;
 SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de pESYNGPRE;
 20 SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de LpESYNGPRE;
 SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de pONY4.0Z;
 SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de pONY8.0Z;
 SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de pONY8.1Z;
 SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de pONY3.1;
 25 SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de pCIneoERev;
 SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de pESYNREV;
 SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de *gag-pol* de VIH con codones optimizados;
 SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de *gag-pol* de EIAV codones optimizados;
 SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de pIRES1hygESYNGP;
 30 SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de pESDSYNGP; y
 SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de pONY8.3G FB29(-).

Ejemplo 1 - VIH

35 Líneas celulares

Se mantuvieron células 293T (33) y células HeLa (34) en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía suero fetal de ternera al 10 % (v/v) y suplementado con L-glutamina y antibióticos (penicilina-estreptomicina). Las células 293T se obtuvieron de D. Baltimore (Rockefeller University).

40

Clones províricos de VIH-1

Se usaron los clones províricos pWI3 (35) y pNL4-3 (36).

45 Construcción de un sistema de empaquetamiento

En uno de los presentes ejemplos, se usó una secuencia de *env* de VIH con codones optimizados modificada (SEC ID. NO: 4). El plásmido de expresión de *env* correspondiente se denomina pSYNGp160mn. La secuencia modificada contiene motivos adicionales no usados por (37). Las secuencias adicionales se tomaron de la secuencia de *env* del VIH de cepa MN y con codones optimizados. Cualquier modificación similar de la secuencia de ácido nucleico funcionaría de forma similar siempre que usase codones que correspondieran a ARNt abundantes (38).

50

Gen de *gag-pol* del VIH-1 con codones optimizados

- 55 Se construyó un gen de *gag-pol* con codones optimizados, mostrado del nucleótido 1.108 al 5.414 de SEC ID NO: 2, hibridando una serie de oligonucleótidos solapantes cortos (aproximadamente 30-40meros con un solapamiento del 25 %, es decir, aproximadamente 9 nucleótidos). Los oligonucleótidos se adquirieron en R&D SYSTEMS (R&D Systems Europe Ltd, 4-10 The Quadrant, Barton Lane, Abingdon, OX14 3YS, RU). La optimización de los codones se realizó usando la secuencia de la cepa de HXB-2 (AC: K03455) (39). También se incluyó la secuencia de consenso de Kozak para el inicio de la traducción óptima (40). Un fragmento desde la base 1.222 a partir del comienzo de *gag* hasta el final de *gag* (1.503) no se optimizó para mantener el sitio de desplazamiento de la fase y el solapamiento entre las fases de lectura de *gag* y *pol*. Este procedía del clon pNL4-3. (Cuando se hace referencia a los números de bases dentro del gen de *gag-pol*, la base 1 es la A del ATG de *gag*, que corresponde a la base 790 desde el comienzo de la secuencia de HXB2. Cuando se hace referencia a secuencias fuera del *gag-pol*, entonces los números se refieren a bases desde el comienzo de la secuencia de HXB2, en la que la base 1 corresponde al comienzo de la LTR de 5'). Se realizaron algunas desviaciones de la optimización para introducir sitios de restricción
- 60
- 65

convenientes. En la Figura 3b, se muestra el uso final de los codones, que ahora se parece al de los genes humanos muy expresados y es bastante diferente del de *gag-pol* del VIH-1 de tipo silvestre. Se clonó el gen en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega) en los sitios *EcoRI*-*NotI*. El plásmido resultante se denomina pSYNGP (Figura 20, SEC ID NO 2). La secuenciación del gen en ambas hebras verificó la ausencia de cualquier error. En la

Figura 8, se muestra una comparación de secuencias entre la secuencia de *gag-pol* de VIH con codones optimizados y de tipo silvestre.

Construcciones de Rev/REE

Se amplificó la secuencia de RRE de VIH-1 (bases 7769-8021 de la secuencia de HXB2) mediante PCR a partir del clon provírico pW13 con cebadores portadores del sitio de restricción *NotI*, y se clonó subsiguientemente en el sitio *NotI* de pSYNGP. Los plásmidos resultantes se denominaron pSYNGP-RRE (RRE en la orientación correcta) y pSYNGP-ERR (RRE en la orientación inversa).

Partículas víricas pseudotipificadas

En una forma del sistema de empaquetamiento, se coexpresa un casete de *gag-pol* sintético con una secuencia codificante de envoltura heteróloga. Esta podría ser, por ejemplo, VSV-G (44, 45), *env* de MLV anfitriónico (46, 47), o cualquier otra proteína que se incorporaría en la partícula de VIH o EIAV (48). Esto incluye moléculas capaces de dirigir el vector hacia tejidos específicos.

Construcciones de genoma vectorial del VIH-1

Se deriva pH6nZ de pH4Z (49) mediante adición de un único nucleótido para colocar un resto de guanina adicional que faltaba de pH4Z en el extremo 5' de la transcripción del genoma del vector con el fin de optimizar la transcripción inversa. Además, se reemplazó el gen codificante de β -galactosidasa (*LacZ*) por un gen codificante de β -galactosidasa de localización nuclear. (Los presentes inventores quieren agradecer a Enca Martin-Rendon y Said Ismail que les hayan proporcionado pH6nZ). Para construir construcciones genómicas de Rev(-), se realizaron las siguientes modificaciones: a) se eliminó un fragmento *PstI*-*PstI* de 1,8 kb de pH6nZ, dando como resultado un plásmido pH6.1nZ, y b) se reemplazó un fragmento de *EcoNI* (lleno)-*SphI* por un fragmento de *SpeI* (lleno)-*SphI* del mismo plásmido (pH6nZ), dando lugar al plásmido pH6.2nZ. En ambos casos, se retuvieron las secuencias en *gag* (nucleótidos 1-625), puesto que han demostrado desempeñar un papel en el empaquetamiento (93). Se eliminaron *Rev*, *RRE* y cualquier otra secuencia de *env* residual. pH6.2nZ contiene además el aceptor de corte y empalme de *env*, mientras que pH6.1nZ no lo tiene.

También se derivó una serie de vectores que comprendían eliminaciones de *gag* adicionales más o menos un donante de corte y empalme (SD) principal mutante (mutación GT a CA) de pH6Z. Estos se obtuvieron mediante PCR con cebadores que tenían un sitio de *NarI* (cebadores 5') y *SpeI* (cebadores 3'). Se insertaron los productos de PCR en pH6Z en los sitios de *NarI*-*SpeI*. Los vectores resultantes se denominaron pHS1nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 40), pHS2nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 260), pHS3nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 360), pHS4nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 625), pHS5nZ (igual que pHS1nZ, pero con un SD mutante), pHS6nZ (igual que pHS2nZ, pero con un SD mutante), pHS7nZ (igual que pHS3nZ, pero con un SD mutante) y pHS8nZ (igual que pHS4nZ, pero con un SD mutante).

Además, se insertó la secuencia de RRE (los nucleótidos 7769-8021 de la secuencia de HXB2) en el sitio de *SpeI* (lleno) de pH6.1nZ, pHS1nZ, pHS3nZ y pHS7nZ, dando lugar los plásmidos pH6.1nZR, pHS1nZR, pHS3nZR y pHS7nZR, respectivamente.

Se han realizado otras modificaciones en el genoma, incluyendo la generación de un vector SIN (mediante eliminación de parte de U3 de 3'), el reemplazo de las LTR por aquellas procedentes de MLV o el reemplazo de parte de U3 de 3' por la región U3 de MLV.

Transfecciones transitorias, transducciones y determinación de títulos víricos

Éstas se realizaron como se ha descrito previamente (49, 50). En resumen, se sembraron células 293T sobre placas de 6 cm y, 24 horas más tarde, se transfectaron transitoriamente mediante tratamiento durante toda una noche con fosfato de calcio. Se reemplazó el medio 12 horas después de la transfección y, a menos que se indique lo contrario, los sobrenadantes se cosecharon 48 horas después de la transfección, se filtraron (a través de filtros de 0,22 o 0,45 μ m) y se titularon mediante transducción de células 293T. Por este motivo, se añadió sobrenadante a diluciones apropiadas de la reserva original a células 293T (cultivadas en placas de 6 o 12 pocillos 24 horas antes de la transducción). Se añadieron, a cada pocillo, 8 μ g/ml de Polybrene (Sigma) y, 48 horas después de la transducción, se determinaron los títulos víricos mediante tinción con X-gal.

Ensayos de β -galactosidasa (β -gal) luminiscentes

Estos se realizaron sobre extractos de células totales usando un sistema indicador de β -gal luminiscente

(CLONTECH). Como control negativo, se usaron células 293T no transfectadas y, como control positivo, se usaron células 293T transfectadas con pCMV- β -gal (CLONTECH).

Análisis de ARN

Se extrajo ARN total o citoplásmico de células 293T usando el mini kit RNeasy (QUIAGEN) 36-48 horas después de la transfección. Se sometieron 5-10 μ g de ARN a análisis de transferencia Northern como se ha descrito previamente (51). El fraccionamiento correcto se verificó mediante tinción del gel de agarosa. Se amplificó una sonda complementaria a las bases 1.222-1.503 del gen *gag-pol* mediante PCR a partir del clon provírico pNL4-3 del VIH-1, y se usó para detectar los ARNm de *gag-pol* tanto con codones optimizados como de tipo silvestre. Una segunda sonda, complementaria a los nucleótidos 1.510-2.290 del gen con codones optimizados, también se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pSYNGP, y se usó para detectar solo los genes con codones optimizados. Se preparó un fragmento de 732 pb, complementario a todos los genomas vectoriales usados en el presente estudio, mediante una digestión con *SpeI*-*AvrII* de pH6nZ. Para normalizar los resultados, se usó una sonda específica para la ubiquitina (CLONTECH). Se marcaron todas las sondas mediante marcaje al azar (STRATAGENE) con α -³²P dCTP (Amersham). Los resultados se cuantificaron usando un Storm PhosphorImager (Molecular Dynamics), y se muestran en la Figura 12. En las fracciones celulares totales, el precursor de ARNr 47S se podía ver claramente, mientras que estaba ausente de las fracciones citoplásmicas. Como era de esperar (52), Rev estimula la acumulación citoplásmica de ARNm de *gag-pol* de tipo silvestre (carriles 1c y 2c). Los niveles de ARN fueron de 10 a 20 veces superiores para el gen con codones optimizados, en comparación con el de tipo silvestre, tanto en las fracciones totales como citoplásmicas (compárense los carriles 3t-2t, 3c-2c, 10c-8c). La secuencia de RRE no desestabilizó significativamente los ARN con codones optimizados, puesto que los niveles de ARN fueron similares para los ARN con codones optimizados, tanto si contenían la secuencia de RRE como si no (compárense los carriles 3 y 5). Rev no potenció notablemente la acumulación citoplásmica de los ARNm de *gag-pol* con codones optimizados, incluso cuando contenían la secuencia de RRE (las diferencias en los niveles de ARN fueron inferiores al doble; compárense los carriles 3-4 o 5-6).

A partir de la comparación de las Figuras 10 y 12, parece que todo el aumento en la expresión proteica de *syngp* podría explicarse por el aumento en los niveles de ARN. Para investigar si esto se debía a niveles de saturación de ARN en la célula, se transfectaron 0,1, 1 y 10 μ g de los vectores de expresión de tipo silvestre o con codones optimizados en células 293T, y se compararon con la producción de proteínas. En todos los casos, la producción de proteínas fue 10 veces superior para el gen con codones optimizados para la misma cantidad de ADN transfectado, mientras que el aumento en los niveles de proteína fue proporcional a la cantidad de ADN transfectado para cada gen individual. Por lo tanto, parece probable que la potenciación de la expresión del gen con codones optimizados se puede atribuir principalmente a los niveles potenciados de ARN presentes en el citoplasma, y no a un aumento de la traducción.

Análisis de proteínas

Se prepararon lisados de células totales a partir de células 293T 48 horas después de la transfección (a menos que se indique lo contrario) con un tampón de lisis alcalina. Para la extracción de proteínas de los sobrenadantes de células, primero, se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 μ m, y se recogieron las partículas de los vectores mediante centrifugación de 1 ml de sobrenadante a 21.000 g durante 30 minutos. Se lavaron los sedimentos con PBS y, después, se volvieron a suspender en un pequeño volumen (2-10 μ l) de tampón de lisis. Se separaron cantidades de proteína iguales en un gel de SDS-poliacrilamida al 10-12 % (v/v). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en las que se sondaron secuencialmente con una dilución a 1:500 de suero humano positivo en VIH-1 (AIDS Reagent Project, ADP508, Panel E) y una dilución a 1:1.000 de anti-IgG humana marcada con peroxidasa de rábano picante (Sigma, A0176). Las proteínas se visualizaron usando el reactivo de detección de transferencia Western ECL o ECL-plus (Amersham). Para verificar la carga de proteína igual, se lavaron las membranas y se volvieron a sondear con una dilución a 1:1.000 de anticuerpo anti-actina (Sigma, A2066), seguido de una dilución a 1:2.000 de anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (Vector Laboratories, PI-1000).

Expresión de productos génicos de *gag-pol* y producción de partículas vectoriales

Se transfectaron transitoriamente el *gag-pol* de tipo silvestre (pGP-RRE3 B Figura 19) (49), y los vectores de expresión con codones optimizados (pSYNGP, pSYN-GP-RRE y pSYNGP-ERR) en células 293T. Se realizaron transfecciones en presencia o ausencia de un vector de expresión de Rev, pCMV-Rev (53), para evaluar la dependencia en Rev para la expresión. Se realizó un análisis de transferencia Western sobre lisados celulares y sobrenadantes para evaluar la producción de proteínas. Los resultados se muestran en la Figura 10. Como era de esperar (54), la expresión del gen de tipo silvestre solo se observa cuando Rev se proporciona en trans (carriles 2 y 3). Por el contrario, cuando se usó el *gag-pol* con codones optimizados, hubo una expresión de alto nivel tanto en presencia como en ausencia de Rev (carriles 4 y 5), indicando que, en este sistema, no había necesidad de Rev. Los niveles de proteína fueron superiores para el gen con codones optimizados que para el *gag-pol* de tipo silvestre (compárense los carriles 4-9 con el carril 3). La diferencia fue más evidente en los sobrenadantes celulares (niveles de proteína aproximadamente 10 veces superiores para el gen con codones optimizados en comparación con el de

tipo silvestre, cuantificado usando un PhosphorImager) que en los lisados celulares.

En estudios previos en los que se ha incluido RRE en los vectores de expresión de *gag-pol* que se habían manipulado mediante ingeniería para eliminar las secuencias de INS, la inclusión del RRE conduce a una reducción de los niveles de proteína, que se restableció proporcionando Rev en trans (55). En manos de los presentes inventores, la presencia del RRE en el ARNm de *gag-pol* de codones completamente optimizados no afectó a los niveles de proteína, y el suministro de Rev en trans no potenció adicionalmente la expresión (carriles 6 y 7).

Para comparar las velocidades de traducción entre el gen de tipo silvestre y con codones optimizados, se determinó la producción de proteínas a partir del vector de expresión de tipo silvestre y con codones optimizados a varios intervalos de tiempo posteriores a la transfección en células 293T. La producción de proteínas y la formación de partículas se determinaron mediante análisis de transferencia Western, y los resultados se muestran en la Figura 11. La producción de proteínas y la formación de partículas fue 10 veces superior para el *gag-pol* con codones optimizados en todos los puntos temporales.

Para determinar adicionalmente si esta expresión potenciada que se observó con el gen con codones optimizados se debía a una mejor traducción o a efectos sobre el ARN, se llevó a cabo el análisis del ARN.

Eficiencia de la producción de vectores usando el gen de *gag-pol* con codones optimizados

Para determinar los efectos del *gag-pol* con codones optimizados sobre la producción de vectores, se usó un genoma de vector del VIH, pH6nZ, y el plásmido de expresión de la envoltura de VSV-G pHCMVG (113), en combinación con pSYNGP, pSYNGP-RRE, pSYNGP-ERR o pGP-RRE3 como fuente para el *gag-pol*, en una proporción de plásmido de 2:1:2 en una cotransfección de 3 plásmidos de células 293T (49). Se evaluaron extractos de células completas y sobrenadantes de cultivos mediante análisis de transferencia Western para determinar la presencia de los productos génicos de *gag* y *gag-pol*. La producción de partículas fue, como era de esperar (Figura 10), de 5 a 10 veces superior para los genes con codones optimizados en comparación con el tipo silvestre.

Para determinar los efectos del gen de *gag-pol* con codones optimizados sobre los títulos de los vectores, se usaron varias proporciones de los componentes vectoriales. Los resultados se muestran en la Figura 21. Cuando el *gag-pol* fue el componente limitante en el sistema (determinado mediante la caída en los títulos observada con el gen de tipo silvestre), los títulos fueron 10 veces superiores para los vectores con codones optimizados. Esto coincide con la mayor producción de proteínas observada para estos vectores, pero sugiere que, en condiciones normales de producción de vectores, *gag-pol* se satura y la optimización de los codones no da ninguna ventaja de rendimiento máximo.

El efecto de las secuencias de INS de *gag* del VIH-1 sobre el gen con codones optimizados depende de la posición

Se ha demostrado previamente que la inserción de secuencias de *gag* del VIH-1 de tipo silvestre, cadena abajo de otros ARN, por ejemplo, *tat* de VIH-1 (56), *gag* de VIH-1 (55) o CAT (57), puede conducir a una reducción espectacular en los niveles de ARNm del estado estacionario, presumiblemente como resultado de las secuencias de INS. En otros casos, por ejemplo, para la β -globina (58), se demostró que el efecto fue dependiente del sitio de corte y empalme. Los ARE (elementos ricos en AU) celulares que se encuentran en la UTR de 3' de los ARNm lábiles pueden conferir desestabilización del ARNm induciendo la desadenilación citoplásmica de las transcripciones (59). Para ensayar si las secuencias de INS de *gag* del VIH-1 desestabilizarían el ARN con codones optimizados, se amplificó la secuencia de *gag* del VIH-1 de tipo silvestre o partes de la misma (nucleótidos 1-625 o nucleótidos 625-1503), mediante PCR a partir del clon provírico pW13. Todos los fragmentos se achataron en sus extremos y se insertaron en pSYNGP o pSYNGP-RRE en un sitio de *EcoRI* o *NotI* como (cadena arriba o cadena abajo del gen de *gag-pol* con codones optimizados, respectivamente). Como controles, también se insertaron en el mismo sitio el *gag* del VIH-1 de WT en la orientación inversa (puesto que se ha mostrado que las secuencias de INS actúan de una manera dependiente de la orientación, (57) (pSYN7) y lacZ, cortado del plásmido pCMV- β gal (CLONTECH) (en la orientación correcta) (pSYN8). En contra de lo esperado, como se muestra en la Figura 13, la secuencia de *gag* del VIH-1 de tipo silvestre no pareció afectar significativamente a los niveles de proteína o de ARN del gen con codones optimizados. Los presentes inventores construyeron además otra serie de plásmidos (mediante PCR y a partir de los mismos plásmidos) en los que el *gag* del VIH-1 de tipo silvestre en la orientación sentido o inversa, subfragmentos de *gag* (nt 1-625 o nt 625-1503), el *gag* del VIH-1 de tipo silvestre sin el ATG o con una mutación del desplazamiento de la fase de 25 bases cadena abajo del ATG, o nt 72-1093 de LacZ (cortado del plásmido pH6Z), o las primeras 1093 bases de lacZ con o sin el ATG se insertaron cadena arriba del gen de *gag-pol* del VIH-1 con codones optimizados en pSYNGP y/o pSYNGP-RRE (pSYN9-pSYN22, Figura 14). El análisis de transferencia Northern mostró que la inserción del gen de *gag* del VIH-1 de tipo silvestre cadena arriba del *gag-pol* del VIH-1 con codones optimizados (pSYN9, pSYN10) conduce a niveles reducidos de ARN en presencia o ausencia de Rev/RRE (Figura 15A, carriles 1-4, y Figura 15B, carriles 1 + 12). El efecto no dependió de la traducción, puesto que la inserción de un *gag* del VIH-1 de tipo silvestre que carece del ATG o con una mutación de desplazamiento de marco (pSYN12, pSYN13 y pSYN14) también disminuyó los niveles de ARN (Figura 15B, carriles 1-7). El análisis de transferencia Western verificó que no hubo producto de traducción de *gag* del VIH-1 para pSYN12-14. Sin embargo, es posible que, puesto que el *gag* del VIH-1 de WT presenta dicho uso adverso de codones, puede actuar como un líder de 5'

largo no traducible para *syngp*, y, si este es el caso, entonces la mutación de ATG no debería tener ningún efecto.

La inserción de partes más pequeñas del gen de *gag* dl VIH-1 de tipo silvestre (pSYN15 y pSYN17) también conduce a una reducción en los niveles de ARN (Figura 15B, carriles 1-3 y 8-9), pero no a niveles tan bajos como cuando se usó la secuencia completa de *gag* (carriles 1-3, 4-7 y 8-9 de la Figura 15b). Esto indica que el efecto de las secuencias de INS depende de su tamaño. La inserción del *gag* del VIH-1 de tipo silvestre en la orientación inversa (pSYN11) no tuvo ningún efecto sobre los niveles de ARN (Figura 15A, carriles 1 y 5-6). Sin embargo, parece que, en ese caso, tuvo lugar un suceso de corte y empalme, según lo indicado por el tamaño del ARN (igual al tamaño del ARN de *gag-pol* con codones optimizados) y por el producto de traducción (*gag-pol*, en cantidades iguales en comparación con pSYNGP, como se verificó mediante análisis de transferencia Western).

Por lo tanto, estos datos indican que las secuencias de inestabilidad de *gag* del VIH-1 de tipo silvestre actúan de una manera dependiente de la posición y del tamaño, probablemente independientemente de la traducción. También se debería observar que el RRE fue incapaz de rescatar los ARN desestabilizados a través de la interacción con Rev.

Construcción de un sistema de vector a base de VIH-1 que carece de todas las proteínas auxiliares

Hasta ahora, se han publicado varios sistemas de vectores a base de VIH-1 que carecen de todas las proteínas auxiliares a excepción de Rev (49, 60). Los presentes inventores deseaban investigar si el gen con codones optimizados permitiría la construcción de un sistema de vectores a base de VIH-1 que careciera de todas las proteínas auxiliares. Inicialmente, se suprimió rev/RRE y cualquier secuencia de *env* residual, pero se mantuvieron los primeros 625 nucleótidos de *gag*, puesto que han mostrado desempeñar un papel en el empaquetamiento eficiente (61). Se obtuvieron dos construcciones genómicas vectoriales, pH6.1nZ (que solo conserva secuencias del VIH hasta nt 625 de *gag*) y pH6.2nZ (igual que pH6.1nZ, pero que también conserva el aceptor de corte y empalme de *env*). Estos derivaron de un genoma vectorial del VIH convencional que contiene RRE y expresa Rev (pH6nZ). El presente sistema detector de tres plásmidos solo expresó ahora *gag-pol* de VIH-1 y las proteínas de envoltura de VSV-G. Los títulos de partículas vectoriales se determinaron como se describe en el apartado anterior. Se usó una proporción de 2:2:1 de genoma vectorial (pH6Z o pH6.1nZ o pH6.2nZ): vector de expresión de *gag-pol* (pGP-RRE3 o pSYNGP):pHCMV-G. Las transfecciones se llevaron a cabo en presencia o ausencia de pCMV-Rev, puesto que la expresión de *gag-pol* todavía era dependiente de Rev para el gen de tipo silvestre. Los resultados se resumen en la Figura 22, e indican que se podría producir un vector de VIH en ausencia total de Rev, pero que los títulos máximos se vieron comprometidos 20 veces menores de lo que se podría lograr en presencia de Rev. Puesto que la expresión de *gag-pol* debería ser la misma para pSYNGP con pH6nZ o pH6.1nZ o pH6.2nZ (dado que es independiente de Rev), así como para pGP-RRE3 cuando se proporciona Rev en trans, se sospechaba que el genoma vectorial conservaba un requisito para Rev y, por lo tanto, limitaba los títulos. Para confirmar esto, se llevó a cabo el análisis de transferencia Northern sobre ARN citoplásmico preparado a partir de células transfectadas con pH6nZ o pH6.1nZ en presencia o ausencia de pCMV-Rev. Como se puede observar en la Figura 17, carriles 1-4, los niveles de ARN citoplásmico derivado de pH6nZ fueron 5-10 veces superiores a los obtenidos con pH6.1nZ (compárense los carriles 1-2 con los carriles 3-4). Estos datos apoyan la noción de que el ARN producido a partir del genoma vectorial requiere el sistema de Rev/RRE para asegurar niveles citoplásmicos elevados. Esto se puede deber a la exportación nuclear ineficaz del ARN, dado que las secuencias de INS que residen en *gag* todavía estaban presentes.

Por lo tanto, para restaurar los títulos, se pueden requerir eliminaciones adicionales en las secuencias de *gag* del genoma vectorial. Hasta la fecha, se ha publicado un empaquetamiento eficiente que requiere 360 (62) o 255 (63) nucleótidos de *gag* en vectores que todavía conservan secuencias de *env*, o aproximadamente 40 nucleótidos de *gag* en una determinada combinación de eliminaciones de mutación de donante de corte y empalme, *gag* y *env* (64, 63). En un intento para eliminar el requisito de Rev/RRE del presente genoma vectorial sin comprometer el empaquetamiento eficiente, se construyó una serie de vectores derivados de pH6nZ que contenían eliminaciones progresivamente más grandes de las secuencias del VIH-1 (solo se conservaron las secuencias cadena arriba y de *gag*) más y menos un donante de corte y empalme principal mutante (SD) (mutación GT a CA). Se determinaron los títulos de partículas vectoriales como se ha descrito anteriormente, y los resultados se resumen en la Figura 23. Como se puede observar, la eliminación de hasta el nucleótido 360 en *gag* (vector pHS3nZ) dio lugar a un aumento de los títulos (en comparación con pH6.1nZ o pH6.2nZ), y solo una reducción de 5 veces (los títulos fueron 1,3-1,7 x 10⁵) en comparación con pH6nZ. Eliminaciones adicionales dieron lugar a títulos menores que pHS3nZ, y similares a pH6.1nZ. Además, la mutación de SD no tuvo un efecto positivo sobre los títulos de los vectores y, en el caso de pHS3nZ, dio como resultado una reducción de 10 veces en los títulos (compárense los títulos para pHS3nZ y pHS7nZ en la Figura 23). El análisis de la transferencia Northern sobre ARN citoplásmico (Figura 17, carriles 1 y 5-12) mostró que los niveles de ARN fueron de hecho mayores para pH6nZ, lo que podría explicar los títulos máximos observados con este vector. Los niveles de ARN fueron iguales para pHS1nZ (carril 5), pHS2nZ (carril 6) y pHS3nZ (carril 7), mientras que los títulos fueron de 5 a 8 veces superiores para pHS3nZ. Es posible que eliminaciones adicionales (de las encontradas en pHS3nZ) en *gag* pudieran dar lugar a un empaquetamiento menos eficiente (en cuanto a VIH-1, la señal de empaquetamiento se extiende en *gag*) y, por lo tanto, incluso aunque los 3 vectores produjeran cantidades similares de ARN, solo pHS3nZ conserva la eficiencia del empaquetamiento máximo. También es interesante observar que la mutación de SD dio lugar a mayores niveles de ARN en el citoplasma (compárense los carriles 6 y 10, 7 y 11 u 8 y 12 en la Figura 17), pero a títulos iguales o inferiores (Figura 23). El

dinucleótido GT que se mutó está en el tallo de SL2 de la señal de empaquetamiento (65). Se ha publicado que SL2 puede no ser muy importante para el encapsidamiento del ARN del VIH-1 (65, 66), mientras que SL3 es de gran importancia (67). El plegamiento de las secuencias de los vectores de tipo silvestre y mutante de SD con el programa informático RNAdraw reveló que la mutación altera significativamente la estructura secundaria del ARN, y no solo de SL2. Por lo tanto, es probable que, aunque la mutación de SD potencie los niveles de ARN citoplásmicos, no aumente los títulos, dado que altera la estructura secundaria de la señal de empaquetamiento.

Para investigar si las diferencias de títulos que se observaron con los vectores menos Rev se debían de verdad a la dependencia de Rev de los genomas, se insertó la secuencia de RRE (nt 7769-8021 de la secuencia de HXB2) en el sitio de *Spel* (cadena abajo de la secuencia de *gag*, y justo cadena arriba del promotor de CMV interno) de pH6.1nZ, pHS1nZ, pHS3nZ y pHS7nZ, dando lugar a los plásmidos pH6.1nZR, pHS1nZR, pHS3nZR y pHS7nZR, respectivamente. Los títulos de las partículas vectoriales se determinaron con pSYNGP y pHCMVG, en presencia o ausencia de Rev (pCMV-Rev) como antes, y los resultados se resumen en la Figura 24. En ausencia de Rev, los títulos se vieron adicionalmente comprometidos para pH6.1nZR (7 veces en comparación con pH6.1nZ), pHS3nZR (6 veces en comparación con pHS3nZ) y pHS7nZR (2,5 veces en comparación con pHS7nZ). Esto era lo esperado, puesto que el RRE también actúa como una secuencia de inestabilidad (68), y de esta forma, cabría esperar que confiriera dependencia en Rev. En presencia de Rev, los títulos se restablecieron hasta los títulos máximos observados para pH6nZ en el caso de pHS3nZR (5×10^5) y pH6.1nZR (2×10^5). Los títulos no se restablecieron para pHS7nZR en presencia de Rev. Esto apoya la hipótesis de que la mutación de SD en pHS7nZ afecta a la estructura de la señal de empaquetamiento, y de este modo, a la capacidad de empaquetamiento de este genoma vectorial, ya que, en este caso, Rev puede ser capaz de estimular los niveles de ARN del genoma vectorial, al igual que para pHS3nZR y pH6.1nZR, pero no puede afectar a la estructura secundaria de la señal de empaquetamiento. Para el vector pHS1nZ, la inclusión del RRE no condujo a una reducción en los títulos. Esto se podría deber al hecho de que pHS1nZ solo contiene 40 nucleótidos de secuencias de *gag*, y por lo tanto, incluso con el RRE, el tamaño de las secuencias de inestabilidad no es mayor que para pHS2nZ, que da títulos iguales a pHS1nZ. Rev fue capaz de restablecer parcialmente los títulos para pHS1nZR (aumento de 10 veces en comparación con pHS1nZ, y 8 veces menor que pH6nZ), pero no completamente como en el caso de pHS3nZ. Esto también coincide con la hipótesis de que 40 nucleótidos de las secuencias de *gag* del VIH-1 pueden no bastar para el empaquetamiento eficiente del ARN del vector, y esto podría explicar el restablecimiento parcial y no completo de los títulos observado con pHS1nZR en presencia de Rev.

Además, se determinaron los títulos de punto final para pHS3nZ y pH6nZ con pSYNGP en las líneas celulares humanas HeLa y HT1080. En ambos casos, los títulos siguieron el patrón observado en las células 293T, siendo los títulos 2-3 veces menores para pHS3nZ que para pH6nZ (véase la Figura 10). Finalmente, se determinó la eficiencia de la transducción del vector producido con pHS3nZ o pH6nZ y diferentes cantidades de pSYNGP o pGP-RRE3 a diferentes mdí (y tan elevada como 1) en células HT1080. Este experimento se realizó puesto que la expresión de *gag-pol* de alto nivel a partir de pSYNGP puede dar lugar a la interferencia por partículas vacías de genoma a concentraciones elevadas del vector. Como era de esperar para las partículas retrovíricas pseudotipificadas de VSVG (69), se correlacionan las eficiencias de transducción con las mdí, tanto si se usaron cantidades elevadas o bajas de pSYNGP, y con pH6nZ o pHS3nZ. Para una mdí de 1, la eficiencia de la transducción fue del aproximadamente 50-60 % en todos los casos (Figura 18). Los datos anteriores indican que no se observa en este sistema experimental ninguna interferencia debida a partículas vacías de genoma.

El gen *gag-pol* con codones optimizados no usa la ruta de exportación nuclear de la exportina-1

Rev media la exportación del ARNm del VIH-1 sin corte y empalme y con corte y empalme individual, a través del receptor de exportación nuclear exportina-1 (CRM1) (70, 71, 72, 73, 74). Se ha demostrado que la leptomicina B (LMB) inhibe la exportación nuclear mediada por NES rica en leucina interrumpiendo la formación del complejo de exportina-1/NES/RanGTP (75, 72). En particular, LMB inhibe la translocación nucleocitoplásmica de Rev y ARNm del VIH dependientes de Rev (76). Para investigar si la exportina-1 media la exportación de las construcciones de *gag-pol* con codones optimizados, se ensayó el efecto de LMB sobre la producción de proteína. Se realizó un análisis de transferencia Western sobre lisados celulares a partir de células transfectadas con las construcciones de *gag-pol* (\pm pCMV-Rev) y tratadas o no con LMB (7,5 nM, durante 20 horas, comenzando el tratamiento 5 horas después de la transfección). Para confirmar que LMB no tuvo efectos globales sobre el transporte, también se midió la expresión de β -gal a partir del plásmido de control pCMV- β Gal. Se usó un control interno de actina para explicar las variaciones proteicas entre muestras. Los resultados se muestran en la Figura 16. Como era de esperar (76), el *gag-pol* de tipo silvestre no se expresó en presencia de LMB (compárense los carriles 3 y 4), mientras que LMB no tuvo ningún efecto sobre la producción de proteína a partir del *gag-pol* con codones optimizados, independientemente de la presencia del RRE en la transcripción y el suministro de Rev en trans (compárense los carriles 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10, 11 y 12, 5-6 y 11-12). La resistencia de la expresión del *gag-pol* con codones optimizados a la inhibición por LMB indica que no se usó la ruta de la exportina-1 y, por lo tanto, se debe de usar una ruta de exportación alternativa. Esto ofrece una posible explicación para la expresión independiente de Rev. El hecho de que la presencia de una interacción no funcional de Rev/RRE no afecte a la expresión implica que el RRE no actúa necesariamente como una señal inhibidora (por ejemplo, retención nuclear) en sí, lo que coincide con las observaciones previas (5, 58).

En conclusión, este es el primer informe de un sistema de vector a base de VIH-1, compuesto de pSYNGP, pHS3nZ y pHCMVG, en el que la producción significativa del vector se puede lograr en ausencia de todas las proteínas auxiliares. Estos datos indican que, para lograr títulos máximos, el genoma del vector de VIH se debe configurar para que conserve el empaquetamiento eficiente, y que esto requiere la conservación de secuencias de *gag* y un donante de corte y empalme. Al reducir la secuencia de *gag* hasta 360 nucleótidos en pHS3nZ y combinar esto con pSYNGP, es posible lograr un título de al menos 10^5 UI/ml, que solo es 5 veces inferior a los niveles máximos logrados en presencia de Rev.

Ejemplo 2 - EIAV (no de acuerdo con la invención)

Casetes de expresión de *gag-pol* de EIAV con codones optimizados

También se examinó si el proceso de optimización de los codones alteraría las propiedades del gen *gag-pol* del lentivirus no primate EIAV. La secuencia es del gen con codones optimizados que se muestra del nucleótido 1.103 al 5.760 de SEC ID NO: 5 (Figura 9). Las secuencias de tipo silvestre y con codones optimizados se indican como WT y CO, respectivamente. El uso de codones se cambió al de genes de mamíferos altamente expresados. pESYNGP (Figura 27 y SEC ID NO: 5) se obtuvo transfiriendo un fragmento *XbaI-NotI* desde un plásmido que contiene un gen *gag/pol* de EIAV con codones optimizados, sintetizado por Operon Technologies Inc., Alameda, CA, en pCneo (Promega). El gen se suministró en una estructura plasmídica patentada, GeneOp. El fragmento transferido a pCneo incluye secuencias que flanquean el ORF de *gag/pol* de EIAV con codones optimizados: tctagaGAATTCGCCACCATG-EIAV *gag/pol*-TGAACCCGGGgcggccgc. Los codones de comienzo ATG y de parada TGA se muestran en negrita, y las secuencias de reconocimiento para los sitios *XbaI* y *NotI* se muestran en minúsculas.

Se evaluó la expresión de Gag/Pol a partir del gen con codones optimizados con respecto a la de diversas construcciones de expresión de *gag/pol* de EIAV de tipo silvestre mediante transfección transitoria de células HEK 293T (Figura 25). Se llevaron a cabo transfecciones usando la técnica de fosfato de calcio, usando moles iguales de cada plásmido de expresión de Gag/Pol junto con un plásmido que expresó Rev de EIAV a partir de la secuencia de tipo silvestre o a partir de una versión de codón optimizado del gen: pCneoEREV (documento WO 99/32646) (Figura 35 y SEC ID NO: 13) o pESYNREV (Figura 36 y SEC ID NO: 14), respectivamente. pESYNREV es un plásmido a base de pCneo (Promega) que se obtuvo introduciendo el fragmento de *EcoRI* a *SaII* a partir de un plásmido de REV de EIAV sintético, obtenido por Operon Technologies Alameda, CA. La estructura principal del plásmido fue el plásmido patentado GeneOp en el que se insertó un gen de REV de EIAV con codones optimizados flanqueado por secuencias de reconocimiento de *EcoRI* y *SaII* y una secuencia de consenso de Kozak para conducir la traducción eficiente del gen. La masa de ADN en cada transfección se ecualizó mediante la adición del plásmido pCneo. En las transfecciones en las que se omitió un plásmido de expresión de Rev, se usó en su lugar una masa similar de pCneo (Promega) (carriles marcados con pCneo). Se prepararon extractos citoplásmicos 48 horas después de la transfección, y se fraccionaron cantidades de 15 µg de proteína mediante SDS-PAGE y después se transfirieron a Hybond ECL. Se sondó la transferencia Western con antisuero policlonal procedente de un caballo infectado con EIAV y después con un anticuerpo secundario, conjugado de anticaballo con peroxidasa de rábano picante. El desarrollo de la transferencia se llevó a cabo usando el kit ECL (Amersham). Los controles positivos para el procedimiento de transferencia y desarrollo, y el extracto citoplásmico procedente de células HEK 293T sin transfectar son como se indica. Se indican las posiciones de diversas proteínas de EIAV.

La expresión a partir de *gag/pol* de tipo silvestre se logró a partir de diversos plásmidos (véase la Figura 25). pONY3.2T es un derivado de pONY3.1 (documento WO 99/32646) (Figura 34 y SEC ID NO: 12) en el que se han realizado mutaciones que suprimen la expresión de Tat y S2. Además, la secuencia de EIAV está truncada cadena abajo del segundo exón de *rev*. En concreto, la expresión de Tat está eliminada por una eliminación de 83 nucleótidos en el exón 2 de *tat*, que corresponde con la secuencia de EIAV de tipo silvestre, n.º de acceso U01866, a la eliminación de los nucleótidos 5234-5316 ambos inclusive. La expresión del ORF de S2 está eliminada mediante una eliminación del nucleótido 51, que corresponde a los nucleótidos 5346-5396 de n.º de acceso U01866. La secuencia de EIAV está eliminada cadena abajo de una posición que corresponde al nucleótido 7815 de n.º de acceso U01866. Estas alteraciones no alteran *rev* y, por lo tanto, la expresión de este gen es expresado igual que para pONY3.1. pONY3.2 OPTI es un derivado de pONY3.1 que tiene las mismas eliminaciones para la ablación de la expresión de Tat y S2 como se ha descrito anteriormente. Además, los primeros 372 nucleótidos de *gag* se han "con codones optimizados" para la expresión en células humanas. La secuencia del tipo silvestre y las secuencias con codones optimizados presentes en pONY3.2OPTI en esta región se comparan en la Figura 43. Se indican las diferencias de las bases entre las secuencias. La región que se optimizó en los codones representa la región de solapamiento entre el vector y las construcciones de expresión de *gag/pol* de tipo silvestre. Cabría esperar que la reducción de homología en esta región mejorara el perfil de seguridad del sistema de vector, debido a la reducción de las ocasiones de recombinación entre el genoma vectorial y las transcripciones de *gag/pol*. 3.2 OPTI-Ihyg es un derivado de 3.2 OPTI en el que el fragmento de *SnaBI-NotI* de 3.2 OPTI se transfiere a pIRES1hygro (Clontech) preparado para la unión mediante digestión con los mismos sitios. Así pues, el gen *gag/pol* se coloca cadena arriba de la higromicina fosfotransferasa de IRES. Cabe señalar el hecho de que la construcción resultante contiene el intrón de pCneo, no de pIRES1hygro. pEV53B es un derivado de PEV53A (documento WO 98/51810) en el que la secuencia derivada de EIAV cadena arriba del codón de iniciación de Gag se reduce para inducir solo el donante de

corte y empalme principal y las secuencias circundantes: CAG/GTAAGATG, en las que el codón de iniciación de Gag se muestra en negrita.

Los resultados (Figura 26) muestran la dependencia en Rev de la expresión de Gag/Pol de pHORSE3.1 (documento WO 99/32646), que tiene una secuencia líder derivada de EIAV que empieza justo cadena abajo del sitio de unión al cebador y un RRE situado cadena abajo de *gag/pol* compuesto de las dos secuencias de EIAV de las que se ha informado que tienen actividad de RRE. La expresión fue potenciada por la misma cantidad cuando la expresión de Rev fue dirigida por los genes de tipo silvestre (pCIneoERev) (Figura 35) o con codones optimizados (pESYNREV) (Figura 36). Este resultado confirma la funcionalidad del plásmido de expresión de Rev con codones optimizados.

En contraste con la expresión de Gag/Pol de pONY3.1, la expresión de pESYNGP no se vio afectada por la presencia de REv; sin embargo, fue ligeramente inferior a la de pONY3.1 o pON3.2T. La expresión a partir de pESYNG-PRRE (Figura 30 y SEC ID NO:7), en el que la secuencia de RRE de EIAV presente en pHORSE3.1 se coloca cadena abajo de *gag/pol*, pareció ligeramente inferior a la de pESYNGP. Los niveles de expresión de 3.2 OPTI y 3.2OPTI-lhyg fueron significativamente inferiores a los de pESYNGP o pONY3.1, incluso en presencia de Rev. Este resultado sugiere que puede haber muchos determinantes de la expresión de Gag/Pol dentro de los primeros 372 nucleótidos del *gag*, y mostró que 3.2 OPTI fue improbable que fuese útil como una base para la producción del vector de EIAV. Además, demuestra que la optimización de los codones de solo ciertas regiones del gen completo de *gag/pol* puede no conducir a niveles elevados de expresión independiente de Rev.

Los presentes inventores demostraron previamente (43) que la secuencia líder 5' (121 pb cadena arriba del codón de inicio ATG) y la secuencia RRE (43) son importantes para la expresión elevada del *gag-pol* de EIAV de tipo silvestre. Se obtuvieron tres construcciones que contenían la secuencia líder (LpESYNGP), las secuencias líder y de RRE (LpESYNGPRRE) o 40 la secuencia de RRE (pESYNGPRRE). Las secuencias de estas construcciones se muestran en SEC ID NO: 6-8 y en las Figuras 28-30. Se transfectaron a células 293T en presencia o ausencia del plásmido de expresión de Rev. El sobrenadante celular se midió entonces para determinar la actividad de transcriptasa inversa (RT), usando un ensayo de RT convencional, para evaluar qué construcción generó la cantidad más elevada de ARNm de *gag-pol*. Los resultados se muestran en las Figuras 39 y 40. A partir de estos resultados, resulta evidente que la secuencia líder 5' conduce a un aumento en la actividad de RT. También se ensayó la capacidad de estas construcciones de expresión de Gag/Pol para apoyar la formación de partículas vectoriales infecciosas mediante transfección transitoria de células HEK 293. Los resultados de este análisis muestran que todas las construcciones podrían proporcionar Gag/Pol de EIAV funcional, y muestran la dependencia en Rev del título con el plásmido del genoma del vector pONY8.0Z, que no codifica ninguna de las proteínas de EIAV (Figura 41).

Se evaluó la capacidad de pESYNGP para actuar en concierto con un plásmido de genoma de vector de EIAV mínimo pONY8.1Z (Figura 33, SEC ID NO: 11) (Figura 42). Los resultados muestran que los títulos obtenidos con pESYNGP y pONY8.1Z son aproximadamente 10 veces inferiores a los de pONY3.1 y pONY8.1Z. Este título reducido refleja la falta de proteína Rev en el sistema, en lugar de una deficiencia de la producción de Gag/Pol que ya se había demostrado que es independiente de la expresión de Rev.

También se ensayó la expresión de Gag/Pol de EIAV a partir de pESDSYNGP (Figura 50 y SEC ID NO: 18), en el que se reemplazó la secuencia de consenso de Kozak de Gag por el donante de corte y empalme de EIAV natural. pESDSYNGP se obtuvo de pESYNGP mediante el intercambio del fragmento de EcoRI-NheI de 306 pb, que va de justo cadena arriba del codón de inicio para *gag/pol* hasta aproximadamente 300 pares de bases dentro del ORF de *gag/pol*, con un fragmento de EcoRI-NheI de 308 pb derivado mediante la digestión de un producto de PCR obtenido usando pESYNGP como molde y usando los siguientes cebadores: SD DIRECTO [GGCTAGAG AATTCCAGG TAAG AT-GGGCGATCCCCTCACCTGG] y SD INVERSO [TTGGGTACTCCTCGCTAGGTTTC]. Esta manipulación sustituye la secuencia de consenso de Kozak cadena arriba del ATG en pESYNGP por el donante de corte y empalme encontrado en EIAV. La secuencia entre el sitio EcoRI y el ATG de *gag/pol* es así CAGGTAAG, exactamente como se encuentra en la secuencia vírica natural. Por lo tanto, el ARNm se elimina con respecto a secuencias cadena arriba, pero no cadena abajo del donante de corte y empalme. Se evaluó el comportamiento de pESDSYNGP con relación a pESYNGP y otros plásmidos de expresión midiendo la actividad de transcriptasa inversa en sobrenadantes a partir de células HEK 293T transfectadas transitoriamente usando una versión a base de Taqman del ensayo de transcriptasa inversa potenciada por producto (PERT). En este método, se libera la transcriptasa inversa asociada con partículas vectoriales mediante tratamiento con detergente suave y se usa para sintetizar ADNc usando ARN del bacteriófago MS2 como molde. El molde de ARN de MS2 y el cebador están presentes en exceso; por tanto, la cantidad de ADNc es proporcional a la cantidad de RT liberada de las partículas. Así pues, la cantidad de ADNc sintetizado es proporcional al número de partículas. El ADNc de MS2 se cuantifica entonces usando tecnología Taqman. El ensayo se lleva a cabo en muestras de ensayo en paralelo con una reserva de vectores de título conocido y contenido de partículas estimado. El uso del patrón permite la creación de una "curva patrón", y permite que se calcule el contenido relativo de RT de diversas muestras. En la Figura 49, se muestran los resultados de este análisis. Los resultados muestran que la expresión de Gag/Pol es casi idéntica a partir de pESYNGP y pESDSYNGP. Los resultados también indican que la expresión no es potenciada significativamente por Rev. La actividad del plásmido de expresión de Rev está confirmada por el resultado obtenido con pHORSE +, en el que hay un RRE cadena abajo del *gag/pol* de EIAV de tipo silvestre, y que muestra una

potenciación de 6 veces la expresión en presencia de Rev. También se observó que la expresión a partir de pHORSE se potenció 3 veces en presencia de Rev. Dado que esta construcción no tiene RRE, ello sugiere que Rev puede estar teniendo un efecto potenciador inespecífico sobre la expresión, posiblemente como resultado de su expresión en niveles elevados en este sistema experimental.

Se evaluó la capacidad de pESYNGP para participar en la formación de partículas vectoriales víricas infecciosas, cuando se cotransfecta con plásmidos para el genoma vectorial y la envoltura mediante transfección transitoria de HEK 20 293T, como se ha descrito previamente (49, 50). En resumen, se sembraron células 293T en placas de 6 cm ($1,2 \times 10^6$ /placa) y, 24 horas más tarde, se transfectaron mediante procedimiento con fosfato de calcio. Se reemplazó el medio 12 horas después de la transfección, y se cosecharon los sobrenadantes 48 horas después de la transfección, se filtraron (filtros de $0,45 \mu\text{m}$) y se titularon mediante transducción de D17, células de osteosarcoma canino, en presencia de $8 \mu\text{g/ml}$ de Polybrene (Sigma). Las células se sembraron a $0,9 \times 10^5$ /pocillo en placas de 12 pocillos 24 horas antes del uso en ensayos de valoración. Se realizaron diluciones del sobrenadante en medio completo (DMEM/FBS al 10 %), y se dispusieron alícuotas de 0,5 ml en placas sobre las células D17. 4 horas después de la adición del vector, se suplementó el medio con 1 ml adicional de medio. Se evaluó la transducción mediante tinción con X-gal de las células 48 horas después de la adición de diluciones víricas.

Los genomas vectoriales usados para estos experimentos fueron pONY4.0Z (Figura 31 y SEC ID NO: 9) y pONY8.0Z (Figura 32 y SEC ID NO: 10).

Se derivó pONY4.0Z (documento WO 99/32646) de pONY2.11Z mediante el reemplazo de la región U3 de la LTR de 5' con el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (pCMV). Esto se llevó a cabo de modo que la primera base de la transcripción derivada de este promotor de CMV corresponde a la primera base de la región R. Esta manipulación da lugar a la producción de niveles elevados de genoma vectorial en células transducidas, particularmente células HEK 293T, y se ha descrito previamente (50). pONY4.0Z expresa todas las proteínas de EIAV excepto para la envoltura, cuya expresión se elimina mediante una eliminación de 736 nucleótidos entre los sitios *HindIII* presentes en *env*.

Se derivó pONY8.0Z de pONY4.0Z introduciendo mutaciones que 1) evitaron la expresión de TAT mediante una eliminación de 83 nucleótidos en el exón 2 de tat; 2) evitaron la expresión del S2 ORF mediante una eliminación de 51 nucleótidos; 3) evitaron la expresión de REV mediante la eliminación de una sola base en el exón 1 de rev; y 4) evitaron la expresión de la parte N-terminal de *gag* mediante la inserción de T en los codones de inicio de ATG, cambiando de ese modo la secuencia a ATTG a partir de ATG. Con respecto a la secuencia de EIAV de tipo silvestre, n.º de acceso U01866, estos corresponden a la eliminación de los nucleótidos 5234-5316, ambos inclusive, los nucleótidos 5346-5396, ambos inclusive, y los nucleótidos 5538. La inserción de los restos de T fue detrás de los nucleótidos 526 y 543.

En la Figura 37, y gráficamente en la Figura 38, se muestran tabulados los resultados de este análisis. Las transfecciones se llevaron a cabo con solo 3 plásmidos (genoma de vector, plásmido de expresión de *gag/pol* y plásmido de expresión de VSV-G) - barras con líneas en diagonal o con cuatro plásmidos, que incluyeron el conjunto previo de plásmidos junto con un plásmido adicional que codifica Rev o un plásmido similar que no codifica una proteína funcional - barras rellenas. El resultado muestra que se pueden lograr títulos elevados de vector usando pESYNGP para suministrar Gag/Pol de EIAV. Los títulos más elevados se obtuvieron usando el plásmido del genoma de vector que expresa Rev, pONY4.0Z, y fueron solo ligeramente inferiores a los observados cuando se suministró Gag/Pol con pONY3.1. Se observaron títulos más bajos con el plásmido del genoma vectorial pONY8.0Z con pESYNGP que con pONY3.1. Esto se debe al requisito de expresión de Rev de pONY8.0Z. Rev es expresado por pONY3.1, pero no por pESYNGP. Estos resultados confirman la utilidad del plásmido de expresión de Gag/Pol con codones optimizados.

Uso del gen de *gag/pol* de EIAV sintético en la construcción de líneas celulares que expresan de forma estable *gag/pol* de EIAV

Para la construcción de células de empaquetamiento y productoras para vectores de EIAV, se requieren líneas celulares que expresan cantidades elevadas de *gag/pol* de EIAV. Como una primera etapa en su construcción, se transfectaron de forma estable células HEK 293 con pIRES1hyg ESYNGP (Figura 44 y SEC ID NO: 17), en el que la expresión de *gag/pol* de EIAV está dirigida por un promotor de CMV y está enlazada a un ORF para la expresión de higromicina fosfotransferasa mediante un EMCV IRES. pIRES1hyg ESYNGP se fabricó de la siguiente manera. Se transfirieron el gen *gag/pol* de EIAV sintético y las secuencias flanqueantes desde pESYNGP en el vector de expresión pIRES1hygro (Clontech). En primer lugar, se digirió pESYNGP con *EcoRI*, y se llenaron los extremos mediante el tratamiento con T4DNA polimerasa, y después se digirieron con *NotI*, se preparó pIRES1hygro para la unión con este fragmento mediante digestión con *NsiI*, los extremos se recortaron mediante tratamiento con ADN polimerasa de T4, y después se digirieron con *NotI*. Antes de la transfección en células HEK 293, se digirió pIRES1hyg ESYNGP con *AhdI*, que linealiza el plásmido.

Las líneas celulares clonales se derivaron mediante dilución en serie y se analizaron para determinar la expresión de Gag/Pol mediante un ensayo de transcriptasa inversa potenciada por producto a base de Taqman (PERT). Se

muestran los datos para la línea celular Q3.29, que expresan el nivel más elevado de Gag/Pol. El análisis mostró que el nivel de expresión a partir del casete de Gag/Pol de EIAV con codones optimizados en Q3.29 fue muy similar a lo observado para una línea productora de EIAV, 8Z.20, en la que Gag/Pol se expresa a partir del casete de expresión de tipo silvestre pEV53B, que produjo partículas de vectores a títulos de casi 10^6 unidades transductoras por ml (Figura 45). Suponiendo la amplificación exponencial durante el ensayo, una diferencia del valor de Ct de 1,0 corresponde a una diferencia del doble en la concentración de la transcriptasa inversa liberada de las partículas. Por lo tanto, la diferencia en la expresión de Gag/Pol entre las células Q3-29 y 8Z.20 es de aproximadamente 2-8 veces. Además, los valores de Ct observados indican que el nivel de expresión de Gag/Pol es significativamente mayor que en las muestras de las partículas del vector de pONY8G, con un título de 2×10^6 unidades transductoras por ml en células D17, pero obtenidas mediante transfección transitoria de células HEK 293T. Estos datos indican que la construcción de Gag/Pol de EIAV con codones optimizados se puede usar en la construcción de líneas de empaquetamiento y productoras de EIAV, y confirma el resultado previo de que la expresión es independiente de la expresión de Rev.

La línea celular Q3.29 se ensayó entonces para determinar su capacidad para soportar la producción de partículas vectoriales infecciosas cuando se transfecta con un plásmido de genoma vectorial, pONY8.0Z, y el plásmido de expresión de envoltura de VSV-G, pRV67 y el plásmido de expresión de REV de EIAV, pESYNREV. Además, también se evaluó el comportamiento de un plásmido pONY8.3G FB29 (-) que es la forma modificada del plásmido del genoma vectorial pONY8G. PONY8G es un genoma de vector de EIAV convencional, usado con fines de comparación. Las modificaciones y la construcción de pONY8.3G FB29 (-) (SEC ID NO: 19) se describen en el documento PCT/GB00/03837, y de forma resumida son 1) la introducción de sitios de reconocimiento de loxP cadena arriba y cadena abajo del casete del genoma vectorial; 2) la colocación de un casete de expresión para REV con codones optimizados, derivado de pESYNREV, y dirigido por el promotor FB29 U3 cadena abajo del casete del genoma vectorial y orientado de forma que la dirección de la transcripción estuviera hacia el casete del genoma vectorial. El casete de expresión de REV está situado cadena abajo del sitio loxP de 3'. Así pues, el plásmido pONY8.3G FB29 - porta casetes de expresión para el ARN del genoma vectorial y para Rev de EIAV.

Los títulos se establecieron mediante dilución limitante en células de osteosarcoma canino D17, y se muestran en la Figura 46.

Los títulos obtenidos de las transfecciones 2-6 fueron hasta $4,5 \times 10^6$ unidades transductoras por ml, indicando niveles de expresión de Gag/Pol suficientes para apoyar títulos al menos tan altos. Los títulos obtenidos no fueron mayores cuando se suministró Gag/Pol adicional (transfección 1), indicando que la expresión de Gag/Pol no fue la limitación del título.

Mejora del perfil de seguridad debida a la expresión de Gag/Pol a partir de una construcción de expresión con codones optimizados

La formación de RCR tiene lugar mediante recombinación entre diferentes componentes del sistema vectorial o mediante recombinación de componentes del sistema vectorial con secuencias nucleotídicas presentes en las células productoras. Aunque es posible la recombinación al nivel de ADN durante la construcción de líneas de células productoras (conduciendo quizás a la activación insercional de retroelementos o retrovirus endógenos), se cree que la recombinación para producir RCR ocurre principalmente entre los ARN sometidos a transcripción inversa y, por tanto, ocurre dentro de las partículas vectoriales maduras. Por consiguiente, la recombinación ocurrirá más probablemente entre los ARN que contienen señales de empaquetamiento, tales como el genoma vectorial y el ARNm de *gag/pol*. Sin embargo, normalmente, la transcripción de *gag/pol* se modifica de forma que se elimina con respecto a alguno o a todos los elementos de empaquetamiento definidos, reduciendo de ese modo las ocasiones de su participación en la recombinación.

El proceso de optimización de codones usado para crear el plásmido de expresión de Gag/Pol de VIH y de EIAV, pSYNGP y pESYNGP, también da lugar a la interrupción de las secuencias y estructuras que dirigen el empaquetamiento, como resultado de introducir cambios en aproximadamente cada 3 posiciones nucleotídicas. Los presentes inventores han obtenido pruebas para el menor nivel de incorporación del ARN con codones optimizados derivado de pESYNGP en viriones.

Se comparó el empaquetamiento de los ARNm derivados de un casete de expresión de pEV53B de *gag/pol* de tipo silvestre, y del casete de expresión de *gag/pol* de EIAV con codones optimizados, pESYNGP. Se recogió medio de líneas celulares a base de HEK 293 que se transfectaron de forma estable con pEV53B (línea celular B-241) o con pESYNGP. Ambas líneas celulares producen partículas vectoriales que no contienen ARN vectorial y no tienen envolturas. En algunos experimentos, un plásmido de genoma vectorial de EIAV (pECG3-CZW) se transfectó en las células para que sirva como un control interno positivo para la hibridación y para determinar la presencia de partículas capaces de empaquetar ARN. pECG3-CZW es un derivado de pEC-LacZ (documento WO 98/51810), y se fabricó a partir de este último mediante 1) la reducción de secuencias de *gag* de forma que solo se incluyeron los primeros 200 nucleótidos de *gag*, en lugar de los primeros 577 nucleótidos; y 2) mediante inclusión del elemento regulador posterior a la traducción del virus de la hepatitis de marmota (WHV PRE) (que corresponde a los nucleótidos 901-1800 de n.º de acceso J04514) en el sitio de *NotI* cadena abajo del gen indicador de LacZ.

A continuación, se purificaron parcialmente las partículas víricas derivadas de cada una de las líneas celulares del medio mediante centrifugación con gradiente de densidad en equilibrio. Para ello, se dispusieron en capas 10 ml de medio procedente de células productoras, cosechadas 24 horas después de la inducción con butirato de sodio, sobre un gradiente de sacarosa al 20-60 % (p/p) en tampón de TNE (pH 7,4), y se centrifugaron durante 24 horas a 25.000 rpm y a 4 °C en un rotor SW28. Las fracciones se recogieron de la parte inferior y se evaluaron 10 µl de cada fracción para determinar la actividad de transcriptasa inversa para localizar partículas víricas. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 47, en la que se muestra el perfil de actividad de transcriptasa inversa en función de la fracción de gradiente. En estas figuras, la parte superior del gradiente está a la derecha. Se debería observar que los niveles de actividad de RT a partir de la célula que expresa pESYNGP fueron significativamente menores que a partir de las células que expresan pEV53B. Para determinar el contenido de ARN de los viriones purificados, se reunieron alícuotas de las fracciones de la parte superior, media o inferior (según lo indicado por las barras marcadas T, M y B), y se sometió el ARN procedente de cada fracción a análisis de hibridación de transferencia por ranura. Usando una sonda específica para una región común de *gag/pol* de tipo silvestre y sintético, el encapsidamiento de ARN fue fácilmente detectable en las fracciones pico (M) de viriones sintetizados a partir de la construcción de tipo silvestre (pEV53B), pero no se detectó a partir de los viriones sintetizados a partir de la construcción de Gag/Pol sintético (pESYNGP) (Figura 48). El control para la presencia de la cápsida capaz de llevar a cabo el encapsidamiento fue el genoma vectorial de EIAV G3-CZW, que se detectó fácilmente en fracciones pico a partir de células que expresan las proteínas *gag/pol* de tipo silvestre o sintéticas. Incluso teniendo en cuenta los diferentes niveles de expresión de las construcciones de expresión de Gag/Pol de tipo silvestre y sintético, este resultado indica que el ARN del gen *gag/pol* con codones optimizados está empaquetado significativamente de forma menos eficiente que el gen de tipo silvestre, y representa una mejora significativa para el perfil de seguridad del sistema. Cabe señalar además que el ARN transcrito a partir de pEV53B estaba empaquetado. Este ARN está eliminado con respecto a las secuencias cadena arriba de la secuencia del donante de corte y empalme (CAG/GTAAG), y seguía empaquetado. Esto apunta a la ubicación de los determinantes de empaquetamiento principales dentro de la región codificante de *gag*, y contrasta con las observaciones recogidas sobre la ubicación de la señal de empaquetamiento del VIH-1.

En experimentos adicionales, se ha demostrado que el empaquetamiento de las transcripciones a partir de pEV53B es solo ligeramente inferior al de pEV53A (Figura 51). Esto indica además que las secuencias de empaquetamiento principales están ubicadas en la región codificante de *gag*. En estos experimentos, la línea celular B-241 expresó ARN de pEV53B, y PEV-17 expresó ARN de pEV53A. El genoma vectorial de EIAV usado para confirmar la presencia de partículas vectoriales competentes para el empaquetamiento fue G3-CZR, que es el mismo que G3-CZW, descrito anteriormente, a excepción del reemplazo del elemento regulador posterior a la traducción de la marmota con una secuencia que contiene los elementos de RRE de EIAV. La metodología fue como se ha descrito anteriormente.

Referencias

1. Miller, N. y J. Whelan. 1997. *Hum Gene Ther.* 8:803-15.
2. Lewis y Emerman. 1993. *J. Virol.* 68:510.
3. Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma y D. Trono. 1996. *Science.* 272:263-7.
4. Morgenstern y Land. 1990. *Nucleic Acids Res.* 18: 3587-3596.
5. Chang, D. D. y P. A. Sharp. 1989. *Cell.* 59:789-795.
6. Wang y Semenza. 1993. *Proc Natl Acad Sci.* 90:430.
7. Dachs *et al.* 1997. *Nature Med.* 5:515.
8. Firth *et al.* 1994. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 6496-6500.
9. Madan *et al.* 1993. *Proc Natl Acad Sci.* 90:3928.
10. Semenza y Wang. 1992. *Mol Cell Biol.* 1992. 12: 5447-5454.
11. Takenaka *et al.* 1989. *J Biol Chem.* 264: 2363-2367.
12. Peshavaria y Day. 1991. *Biochem J.* 275: 427-433.
13. Inou *et al.* 1989. *J Biol Chem.* 264: 14954-14959.
14. Overell *et al.* 1988. *Mol Cell Biol.* 8: 1803-1808.
15. Attenello y Lee. 1984. *Science.* 226: 187-190.
16. Gazit *et al.* 1985. *Cancer Res.* 55: 1660-1663.
17. Yu *et al.* 1986. *Proc Natl Acad Sci.* 83: 3194-3198.
18. Dougherty y Temin. 1987. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 1197-1201.
19. Hawley *et al.* 1987. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 2406-2410.
20. Yee, J. K., A. Miyahara, P. LaPorte, K. Bouic, J. C. Burns y T. Friedmann. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 91:9564-8.
21. Jolley *et al.* 1983. *Nucleic Acids Res.* 11: 1855-1872.
22. Emerman y Temin. 1984. *Cell.* 39: 449-467.
23. Herman y Coffin. 1987. *Science.* 236: 845-848.
24. Bender *et al.*, 1987, *J Virol* 61: 1639-1646.
25. Pear *et al.*, 1993, *Proc Natl Acad Sci* 90: 8392-8396.
26. Danos y Mulligan. 1998. *Proc Natl Acad Sci.* 85: 6460-6464.

27. Markowitz *et al.* 1988. *Virology*. 167: 400-406.
28. Cosset *et al.*, 1995, *J. Virol.* 69: 7430-7436.
29. Mebatsion *et al.* 1997. *Cell*. 90: 841-847.
30. Marshall. 1998. *Nature Biotechnology*. 16: 129.
- 5 31. *Nature Biotechnology*. 1996. 14:556.
32. Wolff y Trubetskoy. 1998. *Nature Biotechnology*. 16: 421.
33. DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P.-M. Leong, J. H. Miller y M. P. Calos. 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7:379-387.
34. Gey, G. O., W. D. Coffman y M. T. Kubicek. 1952. *Cancer res.* 12:264.
35. Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman y D. Baltimore. 1989. *J. Virol.* 63:3708-3713.
- 10 36. Adachi, A., H. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson y M. Martin. 1986. *J. Virol.* 59:284-291.
37. Haas, J., E.-C. Park y B. Seed. 1996. *Current Biology*. 6:315.
38. Zolotukhin, S., M. Potter, W. W. Hauswirth, J. Guy y N. Muzyczka. 1996. "A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells". *J Virol.* 70:4646-54.
39. Fisher, A., E. Collalti, L. Ratner, R. Gallo y F. Wong-Staal. 1985. *Nature*. 316:262-265.
- 15 40. Kozak, M. 1992. [Revisión]. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:197-225.
41. Cassan, M., N. Delaunay, C. Vaquero y J. P. Rousset. 1994. *J. Virol.* 68:1501-8.
42. Parkin, N. T., M. Chamorro y H. E. Varmus. 1992. *J. Virol.* 66:5147-51. 68:3888-3895.
43. Mitrophanous K, Yoon S, Rohll J, Patil D, Wilkes F, Kim V, Kingsman S, Kingsman A, Mazarakis N, 1999. *Gene Ther.* 6 (11): 1808-18
- 20 44. Ory, D. S., B. A. Neugeboren y R. C. Mulligan. 1996. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 93:11400-6.
45. Zhu, Z. H., S. S. Chen y A. S. Huang. 1990. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 3:215-9.
46. Chesebro, B., K. Wehrly y W. Maury. 1990. *J Virol.* 64:4553-7.
47. Spector, D. H., E. Wade, D. A. Wright, V. Koval, C. Clark, D. Jaquish y S. A. Spector. 1990. *J Virol.* 64:2298-2308.
- 25 48. Valsesia Wittmann, S., A. Drynda, G. Deleage, M. Aumailley, J. M. Heard, O. Danos, G. Verdier y F. L. Cosset. 1994. *J Virol.* 68:4609-19.
49. Kim, V. N., K. Mitrophanous, S. M. Kingsman y K. A. J. 1998. *J Virol* 72: 811-816.
50. Soneoka, Y., P. M. Cannon, E. E. Ramsdale, J. C. Griffiths, G. Romano, S. M. Kingsman y A. J. Kingsman. 1995. *Nucleic Acids Res.* 23:628-33.
- 30 51. Sagerstrom, C. y H. Sive. 1996. "RNA blot análisis", pág. 83-104. En P. Krieg (ed.), "A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and síntesis", vol. 1. Wiley-Liss Inc., Nueva York.
52. Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel y B. R. Cullen. 1989. *Nature*. 338:254-7.
53. Felber, B. K., M. Hadzopoulou Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland y G. N. Pavlakis. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:1495-1499.
- 35 54. Hadzopoulou Cladaras, M., B. K. Felber, C. Cladaras, A. Athanassopoulos, A. Tse y G. N. Pavlakis. 1989. *J. Virol.* 63:1265-74.
55. Schneider, R., M. Campbell, G. Nasioulas, B. K. Felber y G. N. Pavlakis. 1997. *J Virol.* 71: 4892-903.
56. Schwartz, S., B. K. Felber y G. N. Pavlakis. 1992. *J. Virol.* 66:150-159.
57. Maldarelli, F., M. A. Martin y K. Strebel. 1991 *J. Virol.* 65:5732-5743.
- 40 58. Mikaelian, I., M. Krieg, M. Gait y J. Karn. 1996. *J. Mol. Biol.* 257:246-264.
59. Xu, N., C.-Y. Chen y A.-B. Shyu. 1997. *Mol. Cell. Biol.* 17:4611-4621.
60. Naldini, L. 1998. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:457-463.
61. Parolin, C., T. Dorfman, G. Palu, H. Gottlinger y J. Sodroski. 1994 *J. Virol.*
62. Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. Mandel, M. Nguyen, D. Trono y L. Naldini. 1998. *J. Virol.* 72:8463-8471.
- 45 63. Cui, Y., T. Iwakama y L.-J. Chang. 1999. *J. Virol.* 73:6171-6176.
64. Chang, L.-J., V. Urlacher, T. Iwakama, Y. Cui y J. Zucali. 1999. *Gene Ther.* 6:715-728.
65. Harrison, G., G. Miele, E. Hunter y A. Lever. 1998. *J. Virol.* 72:5886-5896.
66. McBride, M. S. y A. T. Panganiban. 1997. *J. Virol.* 71:2050-8.
67. Lever, A., H. Gottlinger, W. Haseltine y J. Sodroski. 1989 *J. Virol.* 63:4085-7.
- 50 68. Brighty, D. y M. Rosenberg. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:8314-8318.
69. Arai, T., M. Takada, M. Ui y H. Iba. 1999. *Virology*. 260:109-115.
70. Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida y I. W. Mattaj. 1997. *Cell*. 90:1051-1060.
71. Fridell, R. A., H. P. Bogerd y B. R. Cullen. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:4421-4.
72. Pollard, V. y M. Malim. 1998. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:491-532.
- 55 73. Stade, K., C. S. Ford, C. Guthrie y K. Weis. 1997. *Cell*. 90:1041-1050.
74. Ullman, K. S., M. Powers, A. y D. J. Forbes. 1997. *Cell*. 90:967-970.
75. Otero, G. C., M. E. Harris, J. E. Donello y T. J. Hope. 1998. *J. Virol.* 72:7593-7597.
76. Wolff *et al.* 1997. *Chem Biol.* 4: 139-147.

LISTADO DE SECUENCIAS

| | |
|----|--|
| | <110> Oxford Biomedica (UK) Limited |
| 5 | <120> Método |
| | <130> P008827EPA |
| 10 | <150> GB 0009760.0 <151> 19-04-2000 |
| | <160> 37 |
| 15 | <170> PatentIn versión 3.5 |
| | <210> 1 <211> 4307 <212> ADN <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| 20 | <400> 1 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| atgggtgcga | gagcgtcagt | attaagcggg | ggagaattag | atcgatggga | aaaaattcgg | 60 |
| ttaaggccag | ggggaaagaa | aaaatatata | ttaaaacata | tagtatgggc | aagcagggag | 120 |
| ctagaacgat | tgcagttaa | tcttgccctg | ttagaacat | cagaaggctg | tagacaaata | 180 |
| ctgggacagc | tacaaccatc | ccttcagaca | ggatcagaag | aacttagatc | attatataat | 240 |
| acagtagcaa | cctctattg | tgtgcatcaa | aggatagaga | taaaagacac | caaggaagct | 300 |
| ttagacaaga | tagaggaaga | gcaaaacaaa | agtaagaaaa | aagcacagca | agcagcagct | 360 |
| gacacaggac | acagcaatca | ggtcagccaa | aattacccta | tagtgcagaa | catccagggg | 420 |
| caaatggtac | atcaggccat | atcacctaga | actttaaatg | catgggtaaa | agtagtagaa | 480 |
| gagaaggctt | tcagcccaga | agtgatcccc | atgttttcag | cattatcaga | aggagccacc | 540 |
| ccacaagatt | taaacaccat | gctaaacaca | gtggggggac | atcaagcagc | catgcaaatg | 600 |
| ttaaaagaga | ccatcaatga | ggaagctgca | gaatgggata | gagtgcattc | agtgcattga | 660 |
| gggcctattg | caccaggcca | gatgagagaa | ccaaggggaa | gtgacatagc | aggaactact | 720 |
| agtacccttc | aggaacaaat | aggatggatg | acaaataatc | cacctatccc | agtaggagaa | 780 |
| atttataaaa | gatggataat | cctgggatta | aataaaatag | taagaatgta | tagccctacc | 840 |
| agcatttctg | acataagaca | aggaccaaa | gaacccttta | gagactatgt | agaccgggtc | 900 |
| tataaaaactc | taagagccga | gcaagcttca | caggaggtaa | aaaattggat | gacagaaacc | 960 |
| ttgttgggtc | aaaatgcgaa | cccagattgt | aagactattt | taaaagcatt | gggaccagcg | 1020 |
| gctacactag | aagaaatgat | gacagcatgt | caggagtag | gaggaccggg | ccataaggca | 1080 |
| agagttttgg | ctgaagcaat | gagccaagta | acaaattcag | ctaccataat | gatgcagaga | 1140 |
| ggcaatttta | ggaaccaaag | aaagattgtt | aagtgtttca | attgtggcaa | agaagggcac | 1200 |
| acagccagaa | attgcagggc | ccctaggaaa | aagggctgtt | ggaaatgtgg | aaaggaagga | 1260 |
| caacaaatga | aagattgtac | tgagagacag | gctaattttt | tagggaagat | ctggccttcc | 1320 |
| tacaagggaa | ggccagggaa | tttcttctag | agcagaccag | agccaacagc | cccaccagaa | 1380 |
| gagagcttca | ggtctggggt | agagacaaca | actccccctc | agaagcagga | gccgatagac | 1440 |
| aaggaactgt | atcctttaac | ttccctcagg | tcactctttg | gcaacgaccc | ctcgtcacia | 1500 |
| taaagatagg | ggggcaacta | aaggaagctc | tattagatac | aggagcagat | gatacagtat | 1560 |
| tagaagaaat | gagtttgcca | ggaagatgga | aaccaaaaat | gataggggga | attggagggt | 1620 |
| ttatcaaagt | aagacagtat | gatcagatac | tcatagaaat | ctgtggacat | aaagctatag | 1680 |
| gtacagtatt | agtaggacct | acacctgtca | acataattgg | aagaaatctg | ttgactcaga | 1740 |
| ttggttgcac | tttaaatttt | cccattagcc | ctattgagac | tgtaccagta | aaattaaagc | 1800 |
| caggaatgga | tggcccaaaa | gttaaacaat | ggccattgac | agaagaaaaa | ataaaagcat | 1860 |
| tagtagaaat | ttgtacagag | atggaaaagg | aagggaaaat | ttcaaaaatt | gggcctgaaa | 1920 |
| atccatacaa | tactccagta | tttgccataa | agaaaaaaga | cagtactaaa | tggagaaaat | 1980 |
| tagtagattt | cagagaactt | aataagagaa | ctcaagactt | ctgggaagtt | caattaggaa | 2040 |
| taccacatcc | cgcagggtta | aaaaagaaaa | aatcagtaac | agtactggat | gtgggtgatg | 2100 |
| catatttttc | agttccctta | gatgaagact | tcaggaagta | tactgcattt | accataccta | 2160 |
| gtataaacia | tgagacacca | gggattagat | atcagtacaa | tgtgcttcca | cagggatgga | 2220 |
| aaggatcacc | agcaatatcc | caaagtagca | tgacaaaaat | cttagagcct | tttagaaaac | 2280 |
| aaaatccaga | catagttatc | tatcaatata | tggatgattt | gtatgtagga | tctgacttag | 2340 |
| aaatagggca | gcatagaaca | aaaatagagg | agctgagaca | acatctgttg | aggtggggac | 2400 |
| ttaccacacc | agacaaaaaa | catcagaaag | aacctccatt | cctttggatg | ggttatgaac | 2460 |
| tccatcctga | taaatggaca | gtacagccta | tagtgcctgc | agaaaaagac | agctggactg | 2520 |
| tcaatgacat | acagaagtta | gtggggaaat | tgaattgggc | aagtcagatt | taccagggga | 2580 |

```

ttaaagtaag gcaattatgt aaactcctta gaggaaccaa agcactaaca gaagtaatac 2640
cactaacaga agaagcagag ctagaactgg cagaaaaacag agagattcta aaagaaccag 2700
tacatggagt gtattatgac ccatcaaaag acttaatagc agaaatacag aagcaggggc 2760
aaggccaatg gacatatcaa atttatcaag agccatttaa aaatctgaaa acaggaaaaat 2820
atgcaagaat gaggggtgcc cacactaatg atgtaaaaca attaacagag gcagtgc aaa 2880
aaataaccac agaaagcata gtaatatggg gaaagactcc taaattttaa ctgcccatac 2940
aaaaggaaac atgggaaaca tgggtggacag agtattggca agccacctgg attcctgagt 3000
gggagtttgt taataccctt cccttagtga aattatggta ccagttagag aaagaaccca 3060
tagtaggagc agaaaccttc tatgtagatg gggcagctaa caggagagact aaattaggaa 3120
aagcaggata tggtactaat agaggaagac aaaaagttgt caccctaact gacacaacaa 3180
atcagaagac tgagttacaa gcaatttatc tagctttgca ggattcggga ttagaagtaa 3240
acatagtaac agactcaca tatgcattag gaatcattca agcacaacca gatcaaagt 3300
aatcagagtt agtcaatcaa ataatagagc agttaataaa aaaggaaaag gtctatctgg 3360
catgggtacc agcacacaaa ggaattggag gaaatgaaca agtagataaa ttagtcagt 3420
ctggaatcag gaaagtacta tttttagatg gaatagataa ggccaagat gaacatgaga 3480
aatatcacag taattggaga gcaatggcta gtgattttta cctgccacct gtagtagcaa 3540
aagaaatagt agccagctgt gataaatgtc agctaaaagg agaagccatg catggacaag 3600
tagactgtag tccaggaata tggcaactag attgtacaca tttagaagga aaagttatcc 3660
tggtagcagt tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agttattcca gcagaaacag 3720
ggcaggaaac agcatatttt cttttaaaat tagcagggaag atggccagta aaaacaatac 3780
atactgacaa tggcagcaat ttcaccggtg ctacggttag ggccgctgt tgggtggcg 3840
gaatcaagca ggaatttgga attccctaca atcccaaaag tcaaggagta gtagaatcta 3900
tgaataaaga attaaagaaa attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga 3960
cagcagtaca aatggcagta ttcattccaca attttaaaag aaaagggggg attgggggg 4020
acagtgcagg ggaaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac 4080
aaaaacaaat tacaaaaatt caaaattttt gggtttatta caggacagc agaaattcac 4140
tttggaaagg accagcaaag ctctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata 4200
atagtgcacat aaaagtagtg ccaagaagaa aagcaaagat cattagggat tatggaaaac 4260
agatggcagg tgatgattgt gtggcaagta gacaggatga ggattag 4307

```

<210> 2
 <211> 9772
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pSYNGP

<400> 2

ES 2 618 508 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tcaatattgg | ccattagcca | tattattcat | tggttatata | gcataaatca | atattggcta | 60 |
| ttggccattg | catacgttgt | atctatatca | taatatgtac | atztatattg | gctcatgtcc | 120 |
| aatatgacgg | ccatggttggc | attgattatt | gactagttat | taatagtaat | caattacggg | 180 |
| gtcattagtt | catagcccat | atatggagtt | ccgcgttaca | taacttacgg | taaatggccc | 240 |
| gectggctga | ccgcccacg | acccccgcc | attgacgtca | ataatgacgt | atgttcccat | 300 |
| agtaacgcca | atagggactt | tccattgacg | tcaatgggtg | gagtatttac | ggtaaactgc | 360 |
| ccacttggca | gtacatcaag | tgtatcatat | gccaaagtccg | ccccctattg | acgtcaatga | 420 |
| cggtaaattg | ccgccttggc | attatgccc | gtacatgacc | ttacgggaact | ttcctacttg | 480 |
| gcagtacatc | tacgtattag | tcacgctat | taccatgggtg | atgcgggtttt | ggcagtacac | 540 |
| caatggggcgt | ggatagcggg | ttgactcacg | gggatttcca | agtctccacc | ccattgacgt | 600 |
| caatggggagt | ttgttttggc | acaaaaatca | acgggacttt | ccaaaatgtc | gtaacaactg | 660 |
| cgatcgcccg | ccccgttgac | gcaaatgggc | ggtaggcgtg | tacggtgga | ggctatatata | 720 |
| agcagagctc | gtttagtga | ccgtcagatc | actagaagct | ttattgcggg | agtttatcac | 780 |
| agttaaattg | ctaacgcagt | cagtgcctct | gacacaacag | tctcgaactt | aagctgcagt | 840 |
| gactctctta | aggtagcctt | gcagaagttg | gtcgtgaggc | actgggcagg | taagtatcaa | 900 |
| ggttacaaga | caggtttaag | gagaccaata | gaaactgggc | ttgtcgagac | agagaagact | 960 |
| cttgcgtttc | tgataggcac | ctattggctc | tactgacatc | cactttgcct | ttctctccac | 1020 |
| aggtgtccac | tcccagttca | attacagctc | ttaaggctag | agtacttaac | acgactcaat | 1080 |
| ataggctagc | ctcgagaatt | cgcaccatg | ggcgcccgcg | ccagcgtgct | gtcgggcggc | 1140 |
| gagctggacc | gctgggagaa | gatccgctg | cgccccggcg | gcaaaaagaa | gtacaagctg | 1200 |
| aagcacatcg | tgtgggccag | ccgcgaactg | gagcgcttcg | ccgtgaaccc | cgggctcctg | 1260 |
| gagaccagcg | aggggtgcgg | ccagatcctc | ggccaactgc | agcccagcct | gcaaacgggc | 1320 |
| agcgaggagc | tgcgcagcct | gtacaacacc | gtggccacgc | tgtactgcgt | ccaccagcgc | 1380 |
| atcgaaatca | aggatacgaa | agaggccctg | gataaaatcg | aagaggaaca | gaataagagc | 1440 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| aaaaagaagg | cccaacaggg | cgccgaggac | accggacaca | gcaaccaggt | cagccagaac | 1500 |
| taccccatcg | tgcagaacat | ccaggggag | atggtgcacc | aggccatctc | cccccgacg | 1560 |
| ctgaacgect | gggtgaagg | ggtggaagag | aaggctttta | gcccggaggt | gatacccatg | 1620 |
| ttctcagccc | tgtcagaggg | agccaccccc | caagatctga | acaccatgct | caacacagtg | 1680 |
| gggggacacc | aggccgcat | gcagatgctg | aaggagacca | tcaatgagga | ggctgcccga | 1740 |
| tgggatcggt | tgcacccggt | gcacgcaggg | cccatcgac | cgggcccagat | gcgtgagcca | 1800 |
| cggggctcag | acatcgccgg | aacgactagt | acccttcagg | aacagatcgg | ctggatgacc | 1860 |
| aacaacccac | ccatcccgg | gggagaaatc | tacaaacgct | ggatcatcct | gggcctgaac | 1920 |
| aagatcggtc | gcatgtatag | ccctaccagc | atcctggaca | tccgccaagg | cccgaggaa | 1980 |
| cccttttcgg | actacgtgga | ccggttctac | aaaacgctcc | gcgcccagca | ggctagccag | 2040 |
| gaggtgaaga | actggatgac | cgaaaccccg | ctggtccaga | acgcgaaccc | ggactgcaag | 2100 |
| acgatcctga | aggccctggg | cccagcggct | accctagagg | aaatgatgac | cgctgtcag | 2160 |
| ggagtgggag | gacccggcca | caaggcacgc | gtcctggctg | aggccatgag | ccaggtgacc | 2220 |
| aactccgcta | ccatcatgat | gcagcgccgg | aactttcggg | accaacgcaa | gatcgtaag | 2280 |
| tgttcaact | gtggcaaaga | agggcacaca | gcccgcact | gcaggcccc | taggaaaaag | 2340 |
| ggctgttggg | aatgtggaaa | ggaaggacac | caaatgaaag | attgtactga | gagacaggct | 2400 |
| aatttttttag | ggaagatctg | gccttcccac | aagggaaggc | cagggaattt | tcttcagagc | 2460 |
| agaccagag | caacagcccc | accagaagag | agcttcaggt | ttgggggaag | gacaacaaag | 2520 |
| ccctctcaga | agcaggagcc | gatagacaag | gaactgtatc | ctttagcttc | cctcagatca | 2580 |
| ctctttggca | gcgacccctc | gtcacaataa | agataggggg | gcagctcaag | gaggctctcc | 2640 |
| tggacaccgg | agcagacgac | accgtgctgg | aggagatgtc | gttgccaggc | cgctggaagc | 2700 |
| cgaagatgat | cgggggaatc | ggcggtttca | tcaaggtgcg | ccagtatgac | cagatcctca | 2760 |
| tcgaaatctg | cggccacaag | gctatcggtg | ccgtgctggt | gggccccaca | cccgtcaaca | 2820 |
| tcacggagc | caacctgttg | acgcagatcg | gttgacgct | gaacttcccc | attagcccta | 2880 |
| togagacggt | accggtgaag | ctgaagcccc | ggatggacgg | cccgaaaggtc | aagcaatggc | 2940 |
| cattgacaga | ggagaagatc | aaggcactgg | tggagatttg | cacagagatg | gaaaaggaag | 3000 |
| ggaaaatctc | caagattggg | cctgagaacc | cgtacaacac | gccggtgttc | gcaatcaaga | 3060 |
| agaaggactc | gacgaaatgg | cgcaagctgg | tggacttccg | cgagctgaac | aagcgcacgc | 3120 |
| aagacttctg | ggaggttcag | ctgggcatcc | cgcacccccg | agggctgaag | aagaagaaat | 3180 |
| ccgtgaccgt | actggatgtg | ggtgatgcct | acttctccgt | tccccggac | gaagacttca | 3240 |
| ggaagtacac | tgccttcaca | atcccttcga | tcaacaadga | gacaccgggg | attcgatata | 3300 |
| agtacaacgt | gtgccccag | ggctggaag | gctctcccg | aatcttcag | agtagcatga | 3360 |
| ccaaaatcct | ggagcctttc | cgcaaacaga | accccgacat | cgatcatctat | cagtacatgg | 3420 |
| atgacttgta | cgtgggctct | gatctagaga | tagggcagca | ccgcaccaag | atcgaggagc | 3480 |
| tgcgccagca | cctggttgagg | tggggactga | ccacacccga | caagaagcac | cagaaggagc | 3540 |
| ctcccttcct | ctggatgggt | tacgagctgc | accctgacaa | atggaccgtg | cagcctatcg | 3600 |
| tgctgccaga | gaaagacagc | tggactgtca | acgacataca | gaagctgggt | gggaagttga | 3660 |
| actggggcag | tcagatttac | ccagggatta | aggtgaggca | gctgtgcaaa | ctcctcccg | 3720 |
| gaaccaaggc | actcacagag | cgatccccc | taaccgagga | ggccgagctc | gaactggcag | 3780 |
| aaaaccgaga | gacctaag | gagcccggtg | acggcgtgta | ctatgacccc | tccaaggacc | 3840 |
| tgatcgccga | gacccagaag | caggggcaag | gccagtggac | ctatcagatt | taccaggagc | 3900 |
| ccttcaagaa | cctgaagacc | ggcaagtacg | cccgatgag | gggtgccac | actaacgacg | 3960 |
| tcaagcagct | gaccgaggcc | gtgcagaaga | tcaccaccga | aagcatcggt | atctggggaa | 4020 |
| agactcctaa | gttcaagctg | cccatccaga | aggaaacctg | ggaaacctgg | tggacagagt | 4080 |
| attgggacga | cacctggatt | cctgagtggg | agttcgtcaa | cacccctccc | ctggtgaagc | 4140 |
| tgtgtgtacc | ctgggagaag | gagcccatag | tgggcgccga | aaccttctac | gtggatgggg | 4200 |
| ccgctaacag | ggagactaag | ctgggcaaa | ccggatacgt | cactaacggg | ggcagacaga | 4260 |
| aggttgtcac | cctcactgac | accaccaacc | agaagactga | gctgcaggcc | atttacctcg | 4320 |
| ctttgcagga | ctcgggcctg | gaggtgaaca | tcgtgacaga | ctctcagtat | gccctgggca | 4380 |
| tcattcaagc | ccagccagac | cagagtgaat | ccgagctggt | caatcagatc | atcgagcagc | 4440 |
| tgatcaagaa | ggaaaaggct | tatctggcct | gggtacccgc | ccacaaaggc | attggcggca | 4500 |
| atgagcaggt | cgacaagctg | gtctcggtg | gcacaggaa | ggtgctatc | ctggatggca | 4560 |
| tgcacaaggc | ccaggacgag | cacgagaaat | accacagcaa | ctggcgggcc | atggctagcg | 4620 |
| acttcaacct | gccccctgtg | gtggccaaag | agatcgtggc | cagctgtgac | aagtgtcagc | 4680 |
| tcaaggcgga | agccatgcat | ggccagggtg | actgtagccc | cggcatctgg | caactcgatt | 4740 |
| gcacccatct | ggagggcaag | gttatcctgg | tagccgtcca | tgtggccagt | ggctacatcg | 4800 |
| aggccgaggt | cattcccgc | gaaacagggc | aggagacagc | ctacttctc | ctgaagctgg | 4860 |
| caggccggtg | gccagtgaag | accatccata | ctgacaatgg | cagcaatttc | accagtgcta | 4920 |
| cgggttaagg | cgctgctgg | tgggcgggaa | tcaagcagga | gttcgggac | ccctacaatc | 4980 |
| cccagagatc | gggcgtcgct | gagcttatga | ataaggagtt | aaagaagatt | atcgccagg | 5040 |
| tcagagatca | ggctgagcat | ctcaagaccg | cggctccaaat | ggcggtatc | atccacaatt | 5100 |
| tcaagcggaa | gggggggatt | ggggggtaca | gtgcggggga | gcggatcggt | gacatcatcg | 5160 |
| cgaccgacat | ccagactaag | gagctgcaaa | agcagattac | caagattcag | aatttccggg | 5220 |
| tctactacag | ggacagcaga | aatccctct | ggaaaggccc | agcgaagctc | ctctggaagg | 5280 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gtgagggggc | agtagtgatc | caggataata | ggcacatcaa | ggtgggtgcc | agaagaaagg | 5340 |
| cgaagatcat | tagggattat | ggcaaacaga | tggcgggtga | tgattgcgtg | gcgagcagac | 5400 |
| aggatgagga | ttaggaattg | ggctagagcg | ggcgottccc | tttagtgagg | gttaatgctt | 5460 |
| cgagcagaca | tgataagata | cattgatgag | tttggacaaa | ccacaactag | aatgcagtga | 5520 |
| aaaaaatgct | ttatttgtga | aatttgtgat | gctattgctt | tatttghtaac | cattataagc | 5580 |
| tgcaataaac | aagttaacaa | caacaattgc | attcatttta | tgtttcaggt | tcagggggag | 5640 |
| atgtgggagg | ttttttaaaag | caagtaaaac | ctctacaaaat | gtggtaaaat | ccgataagga | 5700 |
| tcgatccggg | ctggcgtaat | agcgaagagg | cccgcaaccga | tcgcccctcc | caacagttgc | 5760 |
| gcagcctgaa | tggcgaatgg | acgcgccttg | tagcggcgca | ttaagcgcg | cgggtgtggg | 5820 |
| ggttacgcgc | agcgtgaccg | ctacacttgc | cagcgcccta | gcgcccgtc | ctttcgcttt | 5880 |
| cttcccctcc | tttctcgcca | cgttcgcggg | ctttcccctg | caagctctaa | atcgggggct | 5940 |
| cccttttaggg | ttccgattta | gagctttacg | gcacctcgac | cgcaaaaaac | ttgatttggg | 6000 |
| tgatgggtca | cgtagtgggc | catcgccctg | atagacgggt | tttcgcccct | tgacgttggg | 6060 |
| gtccacgttc | tttaatatgtg | gactcttggt | ccaaactgga | acaacactca | accctatctc | 6120 |
| ggtctattct | tttgatttat | aagggaattt | ggcgatttcg | gcctattggg | taaaaaatga | 6180 |
| cgtgatttaa | caaataattta | acgcgaattt | taacaaaata | ttaacgttta | caatttcgcc | 6240 |
| tgatgeggta | ttttctcctt | acgcattctgt | gcgggtatttc | acacgcgata | cgcggtatctg | 6300 |
| cgcagcacca | tggcctgaaa | taacctctga | aagaggaact | tggttaggta | ccttctgagg | 6360 |
| cggaaagaac | cagctgtgga | atgtgtgtca | gttaggggtg | ggaaagtccc | caggctcccc | 6420 |
| agcaggcaga | agtatgcaaa | gcatgcatct | caattagtda | gcaaccagg | gtggaaagtc | 6480 |
| cccaggctcc | ccagcaggca | gaagtatgca | aagcatgcat | ctcaattagt | cagcaaccat | 6540 |
| agtcgccgcc | ctaactccgc | ccatcccgcg | cttaactccg | cccagttccg | cccattctcc | 6600 |
| gccccatgg | tgactaattt | tttttattta | cgcagaggcc | gagggcgccg | ggcctctcga | 6660 |
| gctattccag | aagtagtgag | gaggcttttt | tggaggcccta | ggcttttgca | aaaagcttga | 6720 |
| ttcttctgac | acaacagtct | cgaacttaag | gctagagcca | ccatgattga | acaagatgga | 6780 |
| ttgcacgcag | gttctccggc | cgttgggtg | gagaggctat | tcggctatga | ctgggcacaa | 6840 |
| cagacaatcg | gctgctctga | tgccgcctg | ttccggctgt | cagcgcagg | gcgcccggt | 6900 |
| ctttttgtca | agaccgacct | gtccgggtgc | ctgaatgaac | tgacggacga | ggcagcgcg | 6960 |
| ctatcgtggc | tggccacgac | gggcgttcc | tgccgacgtg | tgctcgacgt | tgtcactgaa | 7020 |
| gcgggaagg | actggctgct | attgggcgaa | gtgcgggggc | aggatctcct | gtcactctca | 7080 |
| cttgctcctg | ccgagaaagt | atccatcatg | gctgatgcaa | tgccggcggt | gcatacgtct | 7140 |
| gatccggcta | cctgcccatt | cgaccacca | gcgaacatc | gcacgcagcg | agcacgtact | 7200 |
| cggatggaag | ccggtcttgt | cgatcaggat | gatctggaag | aagagcatca | ggggctccgc | 7260 |
| ccagccgaac | tgttcgccag | gctcaaggcg | cgcattgccc | acggcgagga | tctcgtcgtg | 7320 |
| acccatggcg | atgectgctt | ggcgaatatc | atgggtgaaa | atggccgctt | ttctggattc | 7380 |
| atcgactgtg | gcggctggg | tgtggcggag | cgtatccagg | acatagcggt | ggctaccgct | 7440 |
| gatattgtcg | aagagcttgg | cggcgaatgg | gctcagcgct | tcctogtgc | ttacgggtac | 7500 |
| gcccgtcccg | attcgacg | catcgccctc | tatcgccctc | ttgaocaggt | cttctgagcg | 7560 |
| ggactctggg | gttcgaaatg | accgaccaag | cgacgcacca | cctgccatca | cgatggccgc | 7620 |
| aataaaaat | ctttattttc | attacatctg | tgtgttggtt | ttttgtgtga | atcgatagcg | 7680 |
| ataaggatcc | gcgtatgggt | cactctcagt | acaatctgct | ctgatgccc | atagttaaag | 7740 |
| cagccccgac | accgcacca | accgcgtgac | gcgccttgac | gggcttgtct | gctcccggca | 7800 |
| tccgtctaca | gacaagctgt | gaccgtctcc | gggagctgca | tgtgtcagag | gttttcaccg | 7860 |
| tcattaccga | aacgcgcgag | acgaaaaggc | ctcgtgatac | gcctattttt | ataggttaat | 7920 |
| gtcatgataa | taatgggttc | ttagacgtca | ggtggcaact | ttcggggaaa | tgtgcgcgga | 7980 |
| acccctatct | gtttattttt | ctaaatacat | tcaaataatg | atccgctcat | gagacaataa | 8040 |
| ccctgataaa | tgtttcaata | atattgaaaa | aggaagagta | tgagtattca | acatttccgt | 8100 |
| gtcgccttta | ttcccttttt | tgccgcatct | tgccctccctg | tttttgctca | cccagaaacg | 8160 |
| ctgggtgaaag | taaaagatgc | tgaagatcag | ttgggtgcac | gagtgggtta | catcgaaactg | 8220 |
| gatctcaaca | gcggtaagat | ccttgagagt | tttcgccccg | aagaacggtt | tccaatgatg | 8280 |
| agcactttta | aagttctgct | atgtggcgcg | gtattatccc | gtattgaocg | cgggcaagag | 8340 |
| caactcggtc | gccgcataca | ctattctcag | aatgacttgg | ttgagtactc | accagtcaca | 8400 |
| gaaaagcatc | ttacggatgg | catgacagta | agagaattat | gcagtgtctg | cataaccatg | 8460 |
| agtataaaca | ctgcggccaa | cttacttctg | acaacgatcg | gaggaccgaa | ggagctaacc | 8520 |
| gctttttttg | acaacatggg | ggatcatgta | actcgccctg | atcggtggga | accggagctg | 8580 |
| aatgaagcca | taccaaaccg | cgaagcgtgac | accacgatgc | ctgtagcaat | ggcaacaacg | 8640 |
| ttgcgcaaac | tattaaactgg | cgaactactt | actctagctt | cccggaacaa | attaatagac | 8700 |
| tggatggagg | cggataaagt | tgcaggacca | cctctgcgct | cgcccttccc | ggctggctgg | 8760 |
| tttattgctg | ataaatctgg | agccggtgag | cgtgggtctc | gcgggtatcat | tgcagcactg | 8820 |
| gggcccagatg | gtaagccctc | cgbatcgtta | gttatctaca | cgacggggag | tcaggcaact | 8880 |
| atggatgaac | gaaatagaca | gatcgtgag | ataggtgcct | cactgattaa | gcatttggtta | 8940 |
| ctgtcagacc | aagtttactc | atatatactt | tagattgatt | taaaacttca | tttttaattt | 9000 |
| aaaaggatct | aggtgaagat | cctttttgat | aatctcatga | ccaaaatccc | ttaacgtgag | 9060 |
| ttttcgttcc | actgagcgtc | agaccccgta | gaaaagatca | aaggatcttc | ttgagatcct | 9120 |

ES 2 618 508 T3

```

ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt 9180
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg 9240
cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 9300
gtagcaccgc ctacatacct cgtcttgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 9360
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg 9420
tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 9480
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 9540
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 9600
ggaaaacgct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 9660
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 9720
ttacgggtcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgg ctcgacagat ct 9772

```

<210> 3

<211> 2571

<212> ADN

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 3

5

```

atgagagtga aggggatcag gaggaattat cagcactggt ggggatgggg cagcatgctc 60
cttgggttat taatgatctg tagtgctaca gaaaaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aaccaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ttgggccaca caagcctgtg taccacaga cccaaccca 240
caagaagtag aattggtaaa tgtgacagaa aattttaaca tgtggaaaaa taacatggta 300
gaacagatgc atgaggatat aatcagttta tgggatcaaa gcctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actgatttga ggaatactac taataccaat 420
aatagtactg ctaataacaa tagtaatagc gagggaaaca taaagggagg agaatgaaa 480
aactgctctt tcaatatcac cacaagcata agagataaga tgcagaaaga atatgcactt 540
ctttataaac ttgatatagt atcaatagat aatgatagta ccagctatag gttgataagt 600
tgtaataacct cagtcattac acaagcttgt ccaaaagatat cctttgagcc aattcccata 660
cactattgtg ccccggtctg ttttgcgatt ctaaaatgta acgataaaaa gttcagtggg 720
aaaggatcat gtaaaaatgt cagcacagta caatgtacac atggaattag gccagtagta 780
tcaactcaac tgctgttaaa tggcagtcta gcagaagaag aggtagtaat tagatctgag 840
aatttcactg ataatgctaa aaccatcata gtacatctga atgaatctgt acaaattaat 900
tgtacaagac ccaactacaa taaaagaaaa aggatacata taggaccagg gagagcattt 960
tatacaacaa aaaatataat aggaactata agacaagcac attgtaacat tagtagagca 1020
aaatggaatg acactttaag acagatagtt agcaaatata aagaacaatt taagaataaa 1080
acaatagctt ttaatcaatc ctcaaggagg gaccagaaaa ttgtaatgca cagttttaat 1140
tgtggagggg aatttttcta ctgtaataca tcaccactgt ttaatagtac ttggaatggg 1200
aataatactt ggaataatac tacagggtca aataacaata tcacacttca atgcaaaata 1260
aaacaaatta taaacatgtg gcaggaagta ggaaaagcaa tgtatgcccc tccattgaa 1320
ggacaaatta gatgttcac aaatattaca gggctactat taacaagaga tgggtgtaag 1380
gacacggaca cgaacgacac cgagatcttc agacctggag gaggagatat gagggacaat 1440
tggaagaagt aattatataa atataaagta gtaacaattg aaccattagg agtagcacc 1500
accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaagag cagcgatagg agctctgttc 1560
cttgggttct taggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcagtgac gctgacggta 1620
caggccagac tattattgtc tggatatagt caacagcaga acaatttgct gagggccatt 1680
gaggcgcaac agcatatgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct ccaggcaaga 1740
gtcctggctg tggaaaagata cctaaaggat caacagctcc tggggttttg gggttgctct 1800
ggaaaactca tttgcaccac tactgtgcct tggaaatgcta gttggagtaa taaatctctg 1860
gatgatattt ggaataacat gacctggatg cagtgggaaa gagaaattga caattacaca 1920
agcttaatat actcattact agaaaaatcg caaacccaac aagaaaagaa tgaacaagaa 1980
ttattggaat tggataaatg ggcaagtttg tggaaattgg ttgacataac aaattggctg 2040
tggtatataa aaatattcat aatgatagta ggaggcttgg taggtttaag aatagttttt 2100
gctgtacttt ctatagtga tagagttagg cagggatact caccattgtc gttgcagacc 2160
cgccccccag ttccgagggg acccgacagg ccgaaggaa tcgaagaaga aggtggagag 2220
agagacagag acacatccgg tcgattagtg catggattct tagcaattat ctgggtcgac 2280
ctgcggagoc tgttctctct cagctaccac cacagagact tactcttgat tgcagcgagg 2340
attgtggaac ttctgggacg caggggtgg gaagtcctca aatattgggt gaatctccta 2400
cagtattgga gtcaggaact aaagagtagt gctgttagct tgcttaatgc cacagctata 2460
gcagtagctg aggggacaga taggggtata gaagtactgc aaagagctgg tagagctatt 2520
ctccacatac ctacaagaat aagacagggc ttggaaaggg ctttgctata a 2571

```

<210> 4
 <211> 2571
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SYNgp-160mn - secuencia de env con codones optimizados

<400> 4

ES 2 618 508 T3

```

atgaggggtga aggggatccg ccgcaactac cagcactggt ggggctgggg cagcatgctc 60
ctggggctgc tgatgatctg cagcgccacc gagaagctgt gggtgaccgt gtactacggc 120
gtgcccgtgt ggaaggaggc caccaccacc ctgttctgcg ccagcgacgc caaggcgtac 180
gacaccgagg tgcacaacgt gtgggccacc caggcgtgcg tgcccaccga ccccaacccc 240
caggaggtgg agctcgtgaa cgtgaccgag aacttcaaca tgtggaagaa caacatggtg 300
gagcagatgc atgaggacat catcagcctg tgggaccaga gcctgaagcc ctgctggaag 360
ctgaccccc ctgtgctgac cctgaactgc accgacctga ggaacaccac caacaccaac 420
aacagcaccg ccaacaacaa cagcaacagc gagggcacca tcaagggcgg cgagatgaag 480
aactgcagct tcaacatcac caccagcatc cgcgacaaga tgcagaagga gtacgacctg 540
ctgtacaagg tggatatcgt gagcatcgac aacgacagca ccagctaccg cctgatctcc 600
tgcaacacca ggtgatcac ccaggcctgc cccaagatca gcttcgagcg catccccatc 660
cactactgcg ccccgccgg ctctcgccatc ctgaagtgc aacgacaagaa gttcagcggc 720
aagggcagct gcaagaacgt gagcaccgtg cagtgcaccc acggcatccg gccggtggtg 780
agcaccacgc tcctgctgaa cggcagcctg gccgaggagg aggtggtgat ccgcagcgag 840
aacttcaccg acaacgcaa gaccatcatc gtgcacctga atgagagcgt gcagatcaac 900
tgccacgctc ccaactacaa caagcgcaag cgcattccaca tcggccccgg gcgcgccttc 960
tacaccacca agaacatcat cggcaccatc cgccaggccc actgcaacat ctctagagcc 1020
aagtggaaag acacccctgc ccagatcgtg agcaagctga aggagcagtt caagaacaag 1080
accatcgtgt tcaaccagag cagcggcgcc gaccccgaga tcgtgatgca cagcttcaac 1140
tgccggcgcg aattcttcta ctgcaacacc agccccctgt tcaacagcac ctggaacggc 1200
aacaacacct ggaacaacac caccggcagc aacaacaata ttacctcca gtgcaagatc 1260
aagcagatca tcaacatgtg gcaggaggtg ggcaaggcca tgtacgcccc ccccatcgag 1320
ggccagatcc ggtgcagcag caacatcacc ggtctgctgc tgaccgcga cggcggaag 1380
gacaccgaca ccaacgacac cgaaatcttc cgccccggcg gcggcgacat gcgcgacaac 1440
tgagatctg agctgtacaa gtacaaggtg gtgacgatcg agccccctgg cgtggcccc 1500
accaaggcca agcgcgcgt ggtgcagcgc gagaagcggg ccgccatcgg cgccctgttc 1560
ctgggcttcc tggggcgcg cggcagcacc atggggcgcc ccagcgtgac cctgaccgtg 1620
caggccccgc tgctcctgag cggcatcgtg cagcagcaga acaacctcct ccgcgccatc 1680
gaggcccgag agcatatgct ccagctcacc gtgtggggca tcaagcagct ccaggcccg 1740
gtgctggccg tggagcgcta cctgaaggac cagcagctcc tgggcttctg gggctgctcc 1800
ggcaagctga tctgcaccac cacggtacc tggaaagcct cctggagcaa caagagcctg 1860
gacgacatct ggaacaacat gacctggatg cagtgggagc gcgagatcga taactacac 1920
agcctgatct acagcctgct ggagaagagc cagaccagc aggagaagaa cgagcaggag 1980
ctgctggagc tggacaagtg ggcgagcctg tggaaactgg tcgacatcac caactggctg 2040
tggtacatca aaatcttcat catgattgtg ggcggcctgg tgggcctccg catcgtgttc 2100
gccgtgatga gcatcgtgaa ccgctgctgc cagggtaca gccccctgag cctccagacc 2160
cgcccccccg tgccgcgcgg gccgacgc cccgagggca tcgaggagga gggcggcgag 2220
cgcgaccgcg acaccagcgg caggctcgtg cacggcttcc tggcgatcat ctgggtcgac 2280
ctccgcagcc tgttctgtt cagctaccac caccgcgacc tgctgctgat cgccgccccg 2340
atcgtggaac tcctaggccg ccgcggctgg gaggtgctga agtactggtg gaacctctc 2400
cagtattgga gccaggagct gaagtccagc gccgtgagcc tgctgaacgc caccgccatc 2460
gccgtggccg agggcaccca ccgcgtgatc gaggtgctcc agaggcccg gagggcgatc 2520
ctgcacatcc ccaccgcat ccgccagggg ctcgagaggg cgctgctgta a 2571

```

<210> 5
 <211> 10112
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pESYNGP

<400> 5

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tgggtatata gcataaatca atattggcta 60

```

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccattgttggc atttgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcatttagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccacgc acccccgcgc attgaagtcg ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggaactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc cccctatttg acgtcaatga 420
cggtaaatgg ccgccttggc attatgcccga gtacatgacc ttacgggact ttctactttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcacgtctat taccatgggt atgcgggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgaagt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggaacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggt agtttatcac 780
agttaaattg ctaacgcagt cagtgccttc gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840
gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcgtttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgctt ttctctccac 1020
aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080
ataggctaga gaattcgcca ccattggcga tccctcacc tgggtccaaag cctgaagaa 1140
actggaaaaa gtcaccgttc agggtagcca aaagcttacc acaggcaatt gcaactgggc 1200
attgtccctg gtggatcttt tccacgacac taatttcgtt aaggagaaag attggaact 1260
cagagacgtg atccccctct tggaggacgt gacccaaaca ttgtctgggc aggagcgcga 1320
agctttcgag cgcacctggt gggccatcag cgcagtcaaa atggggctgc aaatcaacaa 1380
cgtggttgac ggtaaagcta gctttcaact gctccgcgtc aagtacgaga agaaaaccgc 1440
caacaagaaa caatccgaac ctacgcagga gtacccaatt atgatcgacg gcgcgcgcaa 1500
taggaacttc cgcctactga ctcccagggg ctataccacc tgggtcaaca ccatccagac 1560
aaacggactt ttgaacgaag cctcccagaa cctgttcggc atcctgtctg tggactgcac 1620
ctccgaagaa atgaatgctt ttctcgacgt ggtgccagga caggctggac agaaacagat 1680
cctgctcgat gccattgaca agatcgccga cgaactggat aatcgccacc cctgccaaa 1740
cgccccctg gtggctcccc cacagggggc tatccctatg accgctaggt tcattagggg 1800
actgggggtg ccccgcaac gccagatgga gccagcattt gaccaattta ggcagacct 1860
cagacagtggt atcatcgaa atcagagcga cccagattaa gtcatgatcg gaaagcccaa 1920
ggcacagaac atcaggcagg gggccaagga accataacct gagtttgtcg acaggcttct 1980
gtcccagatt aaatccgaag gccacctca ggagatctcc aagttcttga cagacacact 2040
gactatccaa aatgcaaatg aagagtgcag aaacgccatg aggcacctca gacctgaaga 2100
taccctggag gagaaaatgt acgatgtcg cgacattggc actaccaagc aaaagatgat 2160
getgetcgcc aaggctctgc aaaccggcct ggttgggtcca ttcaaaggag gagcactgaa 2220
gggaggtcca ttgaaagctg cacaacatg ttataattgt ggaagccag gacatttatc 2280
tagtcaatgt aggcacctc aagtctgttt taaatgtaaa cagcctggac atttctcaa 2340
gcaatgcaga agtgttccaa aaaacgggaa gcaaggggct caagggaggc ccagaaaaca 2400
aactttcccg atacaacaga agagtcagca caacaaatct gttgtacaag agactctca 2460
gactcaaaat ctgtaccag atctgagcga aataaaaaag gaatacaatg tcaaggagaa 2520
ggatcaagta gaggatctca acctggacag tttgtgggag taacatacaa tctcgagaag 2580
aggcccacta ccactgctct gatcaatgac accctctta atgtgctgct ggacaccgga 2640
gcgcagacca gcttctcac tactgtcac tataacagac tgaataacag aggaaggaaa 2700
taccagggca caggcatcat cggcgttggg ggcaacgtcg aaaccttttc cactcctgtc 2760
accatcaaaa agaaggggag acacattaaa accagaatgc tgggtcgcca catccccgtc 2820
accatccttg gcagagacat tctccaggac ctgggcgcta aactcgtgct ggcacaaactg 2880
tctaaggaaa tcaagtccg caagatcgag ctgaaagagg gcacaatggg tccaaaaatc 2940
ccccagtggc cctgaccaa agagaagctt gagggcgcta aggaaatcgt gcagcgctg 3000
ctttctgagg gcaagattag cgaggccagc gacaataacc cttacaacag cccatcttt 3060
gtgattaaga aaaggagcgg caaatggaga ctctcgagg acctgaggga actcaacaag 3120
accgtccagg tcggaactga gatctctcgc ggactgcctc acccggcggt cctgattaaa 3180
tgcaagcaca tgacagtcct tgacattgga gacgcttatt ttaccatccc cctcgatcct 3240
gaatttcgcc cctatactgc ttttaccatc cccagcatca atcaccagga gcccgataaa 3300
cgctatgtgt ggaagtgcct cccccaggga tttgtgctta gccctacat ttaccagaag 3360
acacttcaag agatcctcca acctttccgc gaaagatacc cagaggttca actctacca 3420
tatattgacg acctgttcat ggggtccaac ggggtctaaga agcagcaca ggaactcatc 3480
atcgaactga gggcaatcct cctggagaaa ggcttcgaga caccgcagc caagctgcaa 3540
gaagttcctc catatagctg gctgggctac cagctttgcc ctgaaaactg gaaagtccag 3600
aagatgcagt tggatatggt caagaaccca acactgaaag acgtccagaa gctcatgggc 3660
aatattacct ggatgagctc cgggaatcct gggcttaccg ttaagcacat tgccgcaact 3720
acaaaaggat gcctggagtt gaaccagaag gtcatttgga cagaggaagc tcagaaggaa 3780
ctggaggaga ataatgaaaa gattaagaat gctcaagggc tccaatacta caatcccga 3840
gaagaaatgt tgtgcgaggt cgaaatcact aagaactacg aagccacct 3900

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cagtcccaag | gcattcttgtg | ggccggaaaag | aaaatcatga | aggccaacaa | aggctgggtcc | 3960 |
| accgttaaaaa | atctgatgct | cctgctccag | cacgtcgcga | ccgagtcctat | caccgcgctc | 4020 |
| ggcaagtgcc | ccaccttcaa | agttcccttc | actaaggagc | aggatgatgtg | ggagatgcaa | 4080 |
| aaaggctggg | actactcttg | gcttcccag | atcgtctaca | cccaccaagt | ggtgcacgac | 4140 |
| gactggagaa | tgaagcttgt | cgaggagccc | actagcggaa | ttacaatcta | taccgacggc | 4200 |
| ggaaaagcaaa | acggagaggg | aatcgctgca | tacgtcacat | ctaacggccg | caccaagcaa | 4260 |
| aagaggctcg | gccctgtcac | tcaccagggtg | gctgagagga | tggctatcca | gatggccctt | 4320 |
| gaggacacta | gagacaagca | ggtgaacatt | gtgactgaca | gctactactg | ctggaaaaac | 4380 |
| atcacagagg | gccttggcct | ggagggaccc | cagtctccct | ggtggcctat | catccagaat | 4440 |
| atccgcgaaa | aggaaaattgt | ctatttcgcc | tgggtgcctg | gacacaaagg | aattttacggc | 4500 |
| aaccaactcg | ccgatgaagc | cgccaaaatt | aaaggagaaa | tcattgcttg | ctaccagggc | 4560 |
| acacagatta | aggagaagag | agacgaggac | gctggctttg | acctgtgtgt | gcctacacgg | 4620 |
| atcatgattc | ccgttagcga | cacaaagatc | attccaaccg | atgtcaagat | ccaggtgcca | 4680 |
| cccaattcat | ttgggtgggt | gaccggaaaag | tccagcatgg | ctaagcaggg | tcttctgatt | 4740 |
| aacgggggaa | tcattgatga | aggatacacc | ggcgaaatcc | aggatgatctg | cacaaatctc | 4800 |
| ggcaaaaagca | atattaagct | tatcgaaggg | cagaagttcg | ctcaactcat | catcctccag | 4860 |
| caccacagca | attcaagaca | accttgggac | gaaaacaaga | ttagccagag | aggatgacaag | 4920 |
| ggcttcggca | gcacaggtgt | gttctgggtg | gagaaacatcc | aggagacaca | ggcagagcac | 4980 |
| gagaattggc | acacctcccc | taagattttg | gcccgaattt | acaagatccc | actgactgtg | 5040 |
| gctaagcaga | tcacacagga | atgccccac | tgcaccaaac | aaggttctgg | ccccgccggc | 5100 |
| tgcgtgatga | ggcccccaaa | tcactggcag | gcagattgca | cccacctcga | caacaaaatt | 5160 |
| atcctgaact | tcgtggagag | caattccggc | tacatccacg | caacactcct | ctccaaaggaa | 5220 |
| aatgcattgt | gcacctccct | cgcaattctg | gaatgggcca | ggctgttctc | tccaaaatcc | 5280 |
| ctgcacaccg | acaacggcac | caactttgtg | gctgaacctg | tggatgaatc | gctgaagtcc | 5340 |
| ctgaaaaatcg | cccacaccac | tggcattccc | tatcacctcg | aaagccaggg | catgtctcag | 5400 |
| agggccaaca | gaactctgaa | agaaaagatc | caatctcaca | gagacaatac | acagacattg | 5460 |
| gaggccgcac | ttcagctcgc | ccttatcacc | tgcacaaaag | gaagagaaaag | catgggcggc | 5520 |
| cagacccccct | gggaggtctt | catcactaac | caggcccagg | tcacccatga | aaagctgtcc | 5580 |
| ttgcagcagg | cccagtcctc | caaaaagtcc | tgtttttata | agatccccgg | tgagcacgac | 5640 |
| tggaaaaggtc | ctacaagagt | tttgtggaaa | ggagacggcg | cagttgtggt | gaacgatgag | 5700 |
| ggcaagggga | tcacgcgtgt | gcccctgaca | cgcaccaagc | ttctcatcaa | gccaaactga | 5760 |
| acccggggcg | gcccgttccc | tttagtgagg | gttaattgctt | cgagcagaca | tgataagata | 5820 |
| cattgatgag | tttggacaaa | ccacaactag | aatcgcagtga | aaaaaatgct | ttatttgtga | 5880 |
| aatttgtgat | gctattgctt | tatttgtaac | cattataagc | tgcaataaac | aagttaacaa | 5940 |
| caacaattgc | attcatttta | tgtttcaggt | tcagggggag | atgtgggagg | ttttttaaag | 6000 |
| caagtataaac | ctctacaaat | gtgggtaaaat | ccgataagga | tcgatccggg | ctggcgtaat | 6060 |
| agcgaagagg | cccgcaccga | tgcgcccttc | caacagttgc | gcagccctgaa | tggcgaatgg | 6120 |
| acgcgcctcg | tagcggcgca | ttaaagcgcg | cgggtgtggt | ggttacgcgc | agcgtgaccg | 6180 |
| ctacacttgc | cagcgcccta | gcgcgcctc | ctttcgcttt | cttcccttcc | ttctcgcca | 6240 |
| cgctcgccgg | ctttcccggt | caagctctaa | atcgggggct | cccttttagg | ttccgattta | 6300 |
| gagctttacg | gcacctcgac | cgcaaaaaac | ttgatttggg | tgatggttca | cgtagtgggc | 6360 |
| catcgccctg | atagacgggt | tttcgcccct | tgacgtttga | gtccacgttc | tttaatatgt | 6420 |
| gactcttggt | ccaaactgga | acaacactca | acctatctc | ggtctattct | tttgatttat | 6480 |
| aagggtatttt | gcccatttcg | gcctatttgg | taaaaaatga | gctgatttaa | caaatattta | 6540 |
| acgogaatttt | taacaaaata | ttaaagttta | caatttcgcc | tgatggggtg | ttttctcctt | 6600 |
| acgcattctgt | gcggtatttc | acacgcgata | cgcggatctg | cgcagcacca | tggcctgaaa | 6660 |
| taacctctga | aagagggaact | tgggttaggtg | ccttctgagg | cggaaaagaac | cagctgtgga | 6720 |
| atgtgtgtca | gttaggggtgt | ggaaagtcct | caggtcccc | agcaggcaga | agtatgcaaa | 6780 |
| gcattgcattc | caattagtca | gcaaccaggt | gtggaaagtc | cccaggctcc | ccagcaggca | 6840 |
| gaagtattgca | aagcatgcac | ctcaattagt | cagcaaccat | agtcccgcgc | ctaactccgc | 6900 |
| ccatcccgcc | cctaactccg | cccagttccg | cccattctcc | gccccatggc | tgactaattt | 6960 |
| tttttatatta | tgcagaggcc | gaggccgcct | cggcctctga | gctattccag | aagtagtgag | 7020 |
| gaggcttttt | tggaggccca | ggctttttga | aaaagcttga | ttcttctgac | acaacagctc | 7080 |
| cgaacttaag | gctagagcca | ccatgattga | acaagatgga | ttgcacgcag | gttctccggc | 7140 |
| cgtctgggtg | gagaggctat | tgggttatga | ctgggcacaa | cagacaatcg | gctgctctga | 7200 |
| tgcgcgcgtg | ttccggctgt | cagcgcaggg | gcgcgccggt | ctttttgtca | agaccgacct | 7260 |
| gtccggtgcc | ctgaatgaac | tgcaggacga | ggcagcgcgg | ctatcgtggc | tggccacgac | 7320 |
| gggcgttcct | tgcgcagctg | tgcctgacgt | tgtcactgaa | gcgggaaggg | actggctgct | 7380 |
| attgggcgaa | gtgcgggggc | aggatctcct | gtcatctcac | cttgcctcctg | ccgagaaaag | 7440 |
| atccatcatg | gctgatgcaa | tgcggcggtc | gcatacgctt | gatccggcta | cctgcccatt | 7500 |
| cgaccaccaaa | gcgaaacatc | gcactgagcg | agcagctact | cggatggaag | ccggtcttgt | 7560 |
| cgatccggat | gatctggacg | aagagcatca | ggggctcgcg | ccagccgaac | tgttcgccag | 7620 |
| gctcaaggcg | cgcattgccc | acggcgagga | tctcgtcgtg | acccatggcg | atgcctgctt | 7680 |
| gccgaatatc | atggtggaaa | atggccgctt | ttctggattc | atcgactgtg | gcgggctggg | 7740 |

```

tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccggt gatattgctg aagagccttg 7800
cggcgaatgg gctgaccgct tctcgtgct ttacgggtat gccgctcccg attcgcagcg 7860
catcgccctt tatcgccctt ttgacgagtt cttctgagcg ggactctggg gttcgaatg 7920
accgaccaag cgacgcccac cctgccaatc cgatggccgc aataaaatat ctttattttt 7980
attacatctg tgtgttggtt ttttgtgtga atcgatagcg ataaggatcc gcgtatggtg 8040
cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagcccgac accgcacca 8100
accgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt 8160
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 8220
acgaaagggc ctctgatac gcctattttt atagggttaat gtcatagataa taatggtttc 8280
ttagacgtca ggtggcactt ttccgggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 8340
ctaaatacat tcaaataatg atccgctcat gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata 8400
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 8460
tgccgcattt tgcccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 8520
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaatg 8580
ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 8640
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 8700
ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 8760
catgacagta agagaattat gcagtgcctg cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 8820
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 8880
ggatcatgta actcgccctg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 8940
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 9000
cgaaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 9060
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 9120
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 9180
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 9240
gatcgctgag atagggtgct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 9300
atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 9360
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 9420
agaccctgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 9480
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccg atcaagagct 9540
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 9600
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 9660
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 9720
gttgactca agacgatagt tacgggataa ggccgagcgg tccggctgaa cggggggttc 9780
gtgcacacag ccagcttgg agogaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 9840
gctatgagaa agcggccacgc tccccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 9900
cagggctgga acaggagagc gcacgagga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 9960
tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 10020
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgggccttt ttacggttcc tggccttttg 10080
ctggcccttt gctcacatgg ctgcacagat ct 10112

```

5 <210> 6
 <211> 10227
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> LpESYNGP

<400> 6

ES 2 618 508 T3

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-----|
| tcaatattgg | ccattagcca | tattattcat | tggttatata | gcataaatca | atattggcta | 60 |
| ttggccattg | catacgttgt | atctatatca | taatattgtac | atztatattg | gctcatgtcc | 120 |
| aatatgaccg | ccatgttggc | attgattatt | gactagttat | taatagtaat | caattacggg | 180 |
| gtcattagtt | catagcccat | atatggagtt | ccgcgttaca | taacttacgg | taaatggccc | 240 |
| gcttggtga | ccgccaacg | acccccgcc | attgacgtca | ataatgacgt | atgttcccat | 300 |
| agtaacgcca | atagggactt | tccattgacg | tcaatgggtg | gagtatttac | ggtaaactgc | 360 |
| ccacttggca | gtacatcaag | tgtatcatat | gccaaagtccg | ccccctattg | acgtcaatga | 420 |
| cgttggtga | ccgcctggc | attatgcca | gtacatgacc | ttacgggact | ttcctacttg | 480 |
| gcagtacatc | tacgtattag | tcacgctat | taccatgggtg | atgcgggtttt | ggcagtacac | 540 |
| caatgggcgt | ggatagcggg | ttgactcacg | gggatttcca | agtctccacc | ccattgacgt | 600 |
| caatgggagt | ttgttttggc | acaaaaatca | acgggacttt | ccaaaatgtc | gtaacaactg | 660 |
| cgatcgcccg | ccccgttgac | gcaaatgggc | ggtaggcgtg | tacgggtggga | ggtctatata | 720 |
| agcagagctc | gttttagtgaa | ccgtcagatc | actagaagct | ttattgcggt | agtttatcac | 780 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| agttaaattg | ctaacgcagt | cagtgtcttct | gacacaacag | tctcgaaactt | aagctgcagt | 840 |
| gactctctta | aggttagcett | gcagaagttg | gtcgtgaggg | actgggcagg | taagtatcaa | 900 |
| ggttacaaga | caggtttaag | gagaccaata | gaaactgggc | ttgtcgagac | agagaagact | 960 |
| cttgcgtttc | tgataggcac | ctattgggtct | tactgacatc | cactttgect | ttctctccac | 1020 |
| aggtgtccac | tcccagttca | attacagctc | ttagggttag | agtacttaat | acgactcaact | 1080 |
| ataggctaga | gaattcgaga | ggggcgagca | ccttacctgt | tgaaacctggc | tgatcgtagg | 1140 |
| atccccggga | cagcagagga | gaacttacag | aagtcttctg | gaggtgttcc | tggccagaac | 1200 |
| acaggaggac | aggttaagatg | ggcgatcccc | tcacctgggtc | caaagccctg | aagaaactgg | 1260 |
| aaaaagtcac | cgttcagggg | agccaaaagc | ttaccacagg | caattgcaac | tgggcattgt | 1320 |
| ccctggtgga | tcttttccac | gacactaatt | tcgttaagga | gaaagattgg | caactcagag | 1380 |
| acgtgatccc | cctcttgagg | gacgtgacct | aaacattgtc | tgggcaggag | cgcgaagctt | 1440 |
| tcgagcgcac | ctgggtgggc | atcagcgag | tcaaaatggg | gctgcaaatc | aacaacgtgg | 1500 |
| ttgacggtaa | agctagcttt | caactgtctc | gcgctaagta | cgagaagaaa | accgcccaaca | 1560 |
| agaaacaatc | cgaacctagc | gaggagtacc | caattatgat | cgacggcgcc | ggcaatagga | 1620 |
| acttccgccc | actgactccc | aggggctata | ccacctgggt | caacaccatc | cagacaaacg | 1680 |
| gacttttgaa | cgaagcctcc | cagaacctgt | tcggcatcct | gtctgtggac | tgcacctccg | 1740 |
| aagaaatgca | tgcttttctc | gacgtgggtg | caggacaggc | tggacagaaa | cgatcagagc | 1800 |
| tcgatgccat | tgacaagatc | gccgacgact | gggataatcg | ccacccccctg | ccaaacgccc | 1860 |
| ctctggtggc | tccccacag | gggcctatcc | ctatgaccgc | taggttcatt | aggggactgg | 1920 |
| gggtgccccg | cgaacgccag | atggagccag | catltgacca | atlttaggcag | acctacagac | 1980 |
| agtggatcat | cgaagccatg | agcgagggga | ttaaagtcac | gatcggaag | cccaaggcac | 2040 |
| agaacatcag | gcagggggcc | aaggaaacct | acctgagtt | tgtcgacagg | cttctgtccc | 2100 |
| agattaaatc | cgaaggccac | cctcaggaga | tctccaagtt | cttgacagac | acactgacta | 2160 |
| tccaaaatgc | aatgaagag | tgcaaaaacg | ccatgaggca | cctcagacct | gaagataccc | 2220 |
| tggaggagaa | aatgtacgca | tgtcgacaca | ttggcactac | caagcaaaaag | atgatgtctg | 2280 |
| tcgccaaggc | tctgcaaaac | ggcctggctg | gtccattcaa | aggaggagca | ctgaaggagg | 2340 |
| gtccaltgaa | agctgcacaa | acatgttata | attgtgggaa | gccaggacat | ttatctagtc | 2400 |
| aatgtagagc | acctaaagtc | tgttttaaat | gtaaacagcc | tggacatttc | tcaaagcaat | 2460 |
| gcagaagtgt | tccaaaaaac | gggaagcaag | gggtcgaagg | gaggccccag | aaacaaaactt | 2520 |
| tcccgatata | acagaagagt | cagcacaca | aatctgttgt | acaagagact | cctcagactc | 2580 |
| aaaatctgta | cccagatctg | agcgaaataa | aaaaggaata | caatgtcaag | agaaggactc | 2640 |
| aagtagagga | tctcaacctg | gacagtttgt | gggagttaaca | tacaatctcg | agaagaggcc | 2700 |
| cactaccatc | gtcctgatca | atgacacccc | tcttaatgtg | ctgctggaca | ccggagccga | 2760 |
| caccagcggt | ctcactactg | ctcactataa | cagactgaaa | tacagaggaa | ggaaatacca | 2820 |
| gggcacaggg | atcatcgggc | ttggaggcaa | cgtcgaaaac | ttttccactc | ctgtcaccat | 2880 |
| caaaaagaag | gggagacaca | ttaaaaccag | aatgctgggtc | gccgacatcc | ccgtcaccat | 2940 |
| ccttggcaga | gacatttctc | aggacctggg | cgctaaactc | gtgctggcac | aactgtctaa | 3000 |
| ggaaaatcaa | ttccgcaaga | tcgagctgaa | agagggcaca | atgggtccaa | aaatccccca | 3060 |
| gtggccccctg | accaaagaga | agcttgaggg | cgctaaggaa | atcgtgcagc | cgctgttttc | 3120 |
| tgaggggcaag | attagcgagg | ccagcgacaa | taacctttac | aacagcccca | tctttgtgat | 3180 |
| taagaaaagg | agcggcaaat | ggagactcct | gcaggacctg | agggaaactca | acaagaccgt | 3240 |
| ccaggtcgga | actgagatct | ctcgcggact | gcctcacccc | ggcggcctga | ttaaatgcaa | 3300 |
| gcacatgaca | gtccttgaca | ttggagacgc | ttattttacc | atccccctcg | atcctgaatt | 3360 |
| tcgccccat | actgctttta | ccatccccag | catcaatcac | caggagccccg | ataaacgcta | 3420 |
| tgtgtggaa | tgcttcccc | agggatttgt | gcttagcccc | tacatttacc | agaagacatc | 3480 |
| tcaagagatc | tcccaacctt | tccgcgaaag | atccccagag | gttcaactct | accaatatat | 3540 |
| ggacgacctg | ttcatggggg | ccaacgggtc | taagaagcag | cacaagggaac | tcattcatoga | 3600 |
| actgagggca | atcctcctgg | agaaaggctt | cgagacaccc | gacgacaagc | tgcaagaagt | 3660 |
| tcctccatat | agctggctgg | gctaccagct | ttgccctgaa | aactggaaag | tcagaagat | 3720 |
| gcagttggat | atgggtcaaga | acccaacact | gaacgacgtc | cagaagctca | tggggcaatat | 3780 |
| tacctggatg | agctccggaa | tccttgggct | taccgttaag | cacattgccc | caactacaaa | 3840 |
| aggatgcttg | gagttgaacc | agaaggctcat | ttggacagag | gaagctcaga | aggaactgga | 3900 |
| ggagaataat | gaaaagatta | agaatgctca | agggctccaa | tactacaatc | ccgaagaaga | 3960 |
| aatgttgtgc | gaggtcgaaa | tcactaagaa | ctacgaagcc | acctatgtca | tcaaacagtc | 4020 |
| ccaaggcatc | ttgtggggcg | gaaagaaaat | catgaaggcc | aacaaaggct | gggtccaccgt | 4080 |
| taaaaatctg | atgctcctgc | tccagcacgt | cgccaccgag | tctatcaccc | gcgtcggcaa | 4140 |
| gtgccccacc | ttcaaagttc | ccttcactaa | ggagcaggtg | atgtgggaga | tgcaaaaagg | 4200 |
| ctggtactac | tcttggcttc | ccgagatcgt | ctacacccac | caagtgggtc | acgacgactg | 4260 |
| gagaatgaag | cttgtcgagg | agcccactag | cgggaattaca | atctataccg | acggcggaag | 4320 |
| gcaaaaacgga | gagggaaatcg | ctgcatacgt | cacatctaac | ggccgcacca | agcaaaagag | 4380 |
| gctcggccct | gtcactcacc | aggtggctga | gaggatggct | atccagatgg | cccttgagga | 4440 |
| cactagagac | aagcaggtga | acattgtgac | tgacagctac | tactgtctgga | aaaacatcac | 4500 |
| agagggccct | ggcctggagg | gaccccagtc | tccttgggtg | cctatcatcc | agaatatccg | 4560 |
| cgaaaaggaa | attgtctatt | tcgcctgggt | gcctggacac | aaaggaaattt | acggcaacca | 4620 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| actcgccgat | gaagccgcc | aaattaaaga | ggaaatcatg | cttgccctacc | agggcacaca | 4680 |
| gattaaggag | aagagagacg | aggacgctgg | ctttgacctg | tgtgtgccat | acgacatcat | 4740 |
| gattcccggt | agcgacacaa | agatcattcc | aaccgatgtc | aagatccagg | tgccacccaa | 4800 |
| ttcatttggt | tgggtgaccg | gaaagtccag | catggctaag | cagggctctc | tgattaacgg | 4860 |
| gggaatcatt | gatgaaggat | acaccggcga | aatccagggtg | atctgcacaa | atatcgga | 4920 |
| aagcaatatt | aagcttatcg | aagggcagaa | gttcgctcaa | ctcatcatcc | tccagcaca | 4980 |
| cagcaattca | agacaacctt | gggacgaaaa | caagattagc | cagagagggtg | acaagggctt | 5040 |
| cggcagcaca | ggtgtgttct | gggtggagaa | catccaggaa | gcacaggacg | agcacgagaa | 5100 |
| ttggcacacc | tccctaaga | ttttggcccg | caattacaag | atcccactga | ctgtggctaa | 5160 |
| gcagatcaca | caggaatgcc | cccactgcac | caaacaaggt | tctggcccg | cgggtgctt | 5220 |
| gatgaggtcc | cccaatcact | ggcaggcaga | ttgcacccac | ctcgacaaca | aaattatcct | 5280 |
| gaccttcgtg | gagagcaatt | cggctacat | ccacgcaaca | ctcctctcca | aggaaaatgc | 5340 |
| atttgtcacc | tccctcgcaa | ttctggaatg | ggccaggctg | ttctctccaa | aatccctgca | 5400 |
| caccgacaa | ggcaccact | ttgtggctga | acctgtgggtg | aatctgctga | agttcctgaa | 5460 |
| aatcgccac | accactggca | ttccctatca | ccctgaaagc | cagggcattg | tccagagggc | 5520 |
| caacagaact | ctgaaagaaa | agatccaatc | tcacagagac | aatacacaga | cattggaggc | 5580 |
| cgcacttcag | ctcgccctta | tcacctgcaa | gaaaggaaga | gaaagcatgg | gcggccagac | 5640 |
| ccctggggag | gtcttcaatc | ctaaccaggc | ccaggctcatc | catgaaaagc | tgctcttgca | 5700 |
| gcaggccag | tctccaaaa | agttctgctt | ttataagatc | cccgttgagc | acgactggaa | 5760 |
| aggtcctaca | agagttttgt | ggaaaggaga | cggcgagtt | gtggtgaacg | atgagggcaa | 5820 |
| ggggatcatc | gctgtgcccc | tgacacgcac | caagcttctc | atcaagccaa | actgaacccg | 5880 |
| ggcgccgcgc | ttcccttttag | tgagggttaa | tgcttcgagc | agacatgata | agatacattg | 5940 |
| atgagtttgg | acaaaaccaca | actagaatgc | agtgaaaaaa | atgctttatt | tgtgaaattt | 6000 |
| gtgatgctat | tgttttattt | gtaaccatta | taagctgcaa | taaacaagtt | aacaacaaca | 6060 |
| attgcattca | ttttatgttt | caggttcagg | ggagatgtg | ggaggttttt | taaagcaagt | 6120 |
| aaaacctcta | caaagtgtgt | aaaatccgat | aaggatcgat | ccgggctggc | gtaatagcga | 6180 |
| agaggcccg | adcgatcgcc | cttcccaaca | gttgcgcagc | ctgaatggcg | aatggacgcg | 6240 |
| ccctgtagcg | gcgcattaa | cgcggccggg | gtggtgggta | cgcgcagcgt | gaccgctaca | 6300 |
| cttgccagcg | ccctagcgcc | cgtctcttcc | gctttcttcc | cttcccttct | cgccacgttc | 6360 |
| gcgggttctc | cccgtaagc | tctaaatcgg | gggctccctt | tagggttccg | atttagagct | 6420 |
| ttacggcacc | tcgacgcgaa | aaaacttgat | ttgggtgatg | gttcacgtat | tgggcccacg | 6480 |
| ccctgataga | cgggttttctg | ccctttgacg | ttggagtcca | cgttctttaa | tagtggactc | 6540 |
| ttgttccaaa | ctggaacaac | actcaacct | atctcggtct | attcttttga | tttataaggg | 6600 |
| atthttgcga | tttcggccta | ttgggttaaaa | aatgagctga | tttaacaaat | atttaacgcg | 6660 |
| aatttttaaca | aaatatatac | gtttacaatt | tcgcctgatg | cggatattttc | tccctaacgca | 6720 |
| tctgtgcggg | atttcacacc | gcatacgcgg | atctgcgcag | caccatggcc | tgaaataacc | 6780 |
| tctgaaagag | gaacttggtt | aggtaccttc | tgaggcggaa | agaaccagct | gtggaatgtg | 6840 |
| tgtcagttag | ggtgtggaaa | gtccccaggc | tccccagcag | gcagaagtat | gcaaagcatg | 6900 |
| catctcaatt | agtcagcaac | caggtgtgga | aagtcaccag | gctccccagc | aggcagaagt | 6960 |
| atgcaaagca | tgcatctcaa | ttagtcagca | accatagtc | cgcctctaac | tccgcccac | 7020 |
| ccgcccctaa | ctccgcccag | ttccgcccac | tctccgcccc | atggctgact | aatttttttt | 7080 |
| atthtatgcag | aggccgaggc | cgcctcgccc | tctgagctat | tccagaagta | gtgaggaggc | 7140 |
| ttttttggag | gcctaggtct | ttgcaaaaag | cttgattctt | ctgacacaa | agtctcgaac | 7200 |
| ttagggtag | agccaccatg | attgaacaag | atggattgca | cgcaggttct | cctggccgctt | 7260 |
| gggtggagag | gctattcggc | tatgactggg | cacacagac | aatcggtgc | tcgtgatccg | 7320 |
| cgtgttccg | gctgtcagcg | cagggcgccc | cggttctttt | tgtcaagacc | gaactgtccg | 7380 |
| gtgcccgtga | tgaactgcag | gacgaggcag | cgcggctatc | gtggctggcc | acgacgggcg | 7440 |
| ttccttgccg | agctgtgctc | gacgttgtca | ctgaagcggg | aagggactgg | ctgctattgg | 7500 |
| gcgaagtgcc | ggggcaggat | ctcctgtcat | ctcaccttgc | tccgtccgag | aaagtatcca | 7560 |
| tcatggctga | tgcaatgcgg | cggctgcata | cgtttgatcc | ggctacctgc | ccattcgacc | 7620 |
| accaagcgaa | acatcgcatc | gagcagacac | gtactcggat | ggaagccggg | cttgtcgatc | 7680 |
| aggatgatct | ggacgaagag | catcaggggc | tcgcgccagc | cgaactgttc | gccaggctca | 7740 |
| aggcgccgat | gcccgaacgg | gaggatctcg | tcgtgaccca | tggcgatgcc | tgtttgcgca | 7800 |
| atatcatggt | ggaaaatggc | cgtttttctg | gattcatcga | ctgtggccgg | ctgggtgtgg | 7860 |
| cggaccgcta | tcaggacata | gcgtttgcta | cccgatgat | tgctgaagag | cttggcgccg | 7920 |
| aatgggctga | cgccttcttc | gtgctttacg | gtatcgccgc | tccgattcgg | cagcgcacg | 7980 |
| ccttctatcg | ccttcttgac | gagttcttct | gagcgggact | ctggggttcg | aaatgaccca | 8040 |
| ccaagcgacg | cccaacctgc | catcacgatg | gcgcacaata | aatatcttta | ttttcattac | 8100 |
| atctgtgtgt | tgggtttttg | tgtgaatcga | tacgcataag | gatccgcgta | tgggtgcactc | 8160 |
| tcagtacaat | ctgctctgat | gcgcgatagt | taagccagcc | ccgacacccg | ccaacacccg | 8220 |
| ctgacgcgcc | ctgacgggct | tgtctgctcc | cggcatccgc | ttacagacaa | gctgtgacccg | 8280 |
| tctccgggag | ctgcatgtgt | cagagggtttt | caccgtcatc | accgaaacgc | gcgagacgaa | 8340 |
| agggcctcgt | gatacgccta | tttttatagg | ttaatgtcat | gataataatg | gtttcttaga | 8400 |
| cgtcaggtgg | cacttttcgg | ggaaatgtgc | gcggaacccc | tatttgttta | tttttctaaa | 8460 |

```

tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 8520
gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc cettattccc ttttttgogg 8580
cattttgect tccgtgtttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtataa gatgctgaag 8640
atcagttggg tgcacgagt gggtacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 8700
agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 8760
gcgcggtatt atcccgatc gacgcggggc aagagcaact cggtcgcgcg atacactatt 8820
ctcagaatga cttgggtgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 8880
cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccattgagtga taacactgcg gccaaacttac 8940
ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atggggggatc 9000
atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 9060
gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcggaac 9120
tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggagggcgat aaagttgcag 9180
gaccacttct gcgctcggcc ctccggctg gctgggtttat tgctgataaa tctggagccg 9240
gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag cctcccgtta 9300
tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 9360
ctgagatagg tgctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata 9420
tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aattttaaag gatctaggtg aagatccttt 9480
ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 9540
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 9600
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa 9660
ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gaggcgcagat accaaatact gtccttctag 9720
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 9780
tgctaactct gttaccagtg gctgctgccg gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 9840
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gggttcgtgca 9900
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 9960
gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 10020
tcggaacagg agagcgacg agggagcttc cagggggaaa cgctcggtat ctttatagtc 10080
ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 10140
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgcctggc 10200
cttttgctca catggctcga cagatct 10227

```

<210> 7
 <211> 10815
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pESYNGPRRE

<400> 7

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| tcaatattgg | ccattagcca | tattattcat | tggttatata | gcataaatca | atattggcta | 60 |
| ttggccattg | catacgttgt | atctatatca | taatatgtac | atztatattg | gctcatgtcc | 120 |
| aatatgaccg | ccatggtggc | attgattatt | gactagttaa | taatagtaat | caattacggg | 180 |
| gtcattagtt | catagcccat | atatggagtt | ccgcgttaca | taacttacgg | taaatggccc | 240 |
| gcctggctga | ccgcccacg | acccccggcc | attgacgtca | ataatgacgt | atgttcccat | 300 |
| agtaacgcca | atagggactt | tccattgacg | tcaatgggtg | gagtatttac | ggtaaactgc | 360 |
| ccacttggca | gtacatcaag | tgtatcatat | gccaaagtccg | ccccctattg | acgtcaatga | 420 |
| cggtaaatgg | cccgctggc | attatgccc | gtacatgacc | ttacgggact | ttcctacttg | 480 |
| gcagtacatc | tacgtattag | tcatcgctat | taccatgggtg | atgcgggtttt | ggcagtacac | 540 |
| caatgggctg | ggatagcggg | ttgactcacg | gggatttcca | agtctccacc | ccattgacgt | 600 |
| caatgggagt | ttgttttggc | acaaaaatca | acgggacttt | ccaaaatgtc | gtaacaactg | 660 |
| cgategcccg | ccccgttgac | gcaaatgggc | ggtaggcgtg | tacgggtggga | ggtctatata | 720 |
| agcagagctc | gtttagtga | ccgtcagatc | actagaagct | ttattgcggg | agtttatcac | 780 |
| agttaaattg | ctaacgcagt | cagtgtttct | gacacaacag | tctcgaactt | aagctgcagt | 840 |
| gactctctta | aggtagcctt | gcagaagttg | gtcgtgaggc | actgggcagg | taagtatcaa | 900 |
| ggttacaaga | caggtttaag | gagaccaata | gaaactgggc | ttgtcgagac | agagaagact | 960 |
| cttgcgtttc | tgataggcac | ctattgggtc | tactgacatc | cactttgcct | ttctctccac | 1020 |
| aggtgtccac | tcccagttca | attacagctc | ttaaggctag | agtacttaat | acgactcact | 1080 |
| ataggctaga | gaattcgcca | ccatgggcga | tcccctcacc | tggtcctaaag | ccctgaagaa | 1140 |
| actggaaaaa | gtcacccgtc | agggtagcca | aaagcttacc | acaggcaatt | gcaactgggc | 1200 |
| attgtccctg | gtggatcttt | tccacgacac | taatttcggt | aaggagaaag | attggcaact | 1260 |
| cagagacgtg | atccccctct | tggaggacgt | gacccaaaca | ttgtctgggc | aggagcgcga | 1320 |
| agctttcgag | cgcacctggt | gggccatcag | cgcagtcaaa | atggggctgc | aaatcaacaa | 1380 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cgtgggttgac | ggtaaagcta | gctttcaact | gtccgcgcgt | aagtacgaga | agaaaaccgc | 1440 |
| caacaagaaa | caatccgaac | ctagcgagga | gtacccaatt | atgatcgacg | gcgcgggcaa | 1500 |
| taggaacttc | cgcccactga | ctcccagggg | ctataccacc | tgggtcaaca | ccatccagac | 1560 |
| aaacggactt | ttgaacgaag | ctcccagaa | cctgttcggc | atcctgtctg | tggactgcac | 1620 |
| ctccgaagaa | atgaatgctt | ttctcgacgt | ggtgccagga | caggctggac | agaaacagat | 1680 |
| cctgctcgat | gccattgaca | agatcgccga | cgactgggat | aatcgccacc | ccctgcoaaa | 1740 |
| cgccctctg | gtggctcccc | cacagggggc | tatccctatg | accgctaggt | tcattagggg | 1800 |
| actgggggtg | ccccgcgaac | gccagatgga | gccagcattt | gaccaattta | ggcagaccta | 1860 |
| cagacagtg | atcatcgaag | ccatgagcga | ggggattaaa | gtcatgatcg | gaaagcccaa | 1920 |
| ggcacagaac | atcaggcagg | gggccaagga | accataccct | gagtttgtcg | acaggcttct | 1980 |
| gtcccagatt | aaatccgaag | gccacccctc | ggagatctcc | aagttcttga | cagacacact | 2040 |
| gactatccaa | aatgcaaatg | aagagtcgag | aaacgccatg | aggcacctca | agcctgaaga | 2100 |
| taccctggag | gagaaaatgt | acgcattgtc | cgacattggc | actaccaagc | aaaagatgat | 2160 |
| gctgctcgcc | aaggctctgc | aaaccggcct | ggctgggtcca | ttcaaaggag | gagcactgaa | 2220 |
| gggaggtcca | ttgaaagctg | cacaaacatg | ttataattgt | gggaagccag | gacatttatc | 2280 |
| tagtcaatgt | agagcaccta | aagtctgttt | taaatgtaaa | cagcctggac | atttctcaaa | 2340 |
| gcaatgcaga | agtgttccaa | aaaacgggaa | gcaaggggct | caagggaggc | ccagaaaaca | 2400 |
| aactttcccg | atacaacaga | agagtcagca | caacaaatct | gttgtacaag | agactcctca | 2460 |
| gactcaaaa | ctgtaccocag | atctgagcga | aataaaaaag | gaatacaatg | tcaaggagaa | 2520 |
| ggatcaagta | gaggatctca | acctggacag | tttgtgggag | taacatacaa | tctcgagaag | 2580 |
| aggccacta | ccatcgctcct | gatcaatgac | acccctctta | atgtgctgct | ggacaccgga | 2640 |
| gccgacacca | gcgttctcac | tactgctcac | tataacagac | tgaatatag | aggaaggaaa | 2700 |
| taccagggca | caggcatcat | cggcgttgg | ggcaacgtcg | aaaccttttc | cactcctgtc | 2760 |
| accatcaaaa | agaaggggag | acacattaaa | accagaatgc | tggctcgccga | catccccgtc | 2820 |
| accatccttg | gcagagacat | tctccaggac | ctgggcgcta | aactcgtgct | ggcacaactg | 2880 |
| tctaaggaaa | tcaagttccg | caagatcgag | ctgaaagagg | gcacaatggg | tccaaaaatc | 2940 |
| ccccagtggc | ccctgaccaa | agagaagcct | gagggcgcta | aggaaatcgt | gcagcgctcg | 3000 |
| ctttctgagg | gcaagattag | cgaggccagc | gacaataacc | cttacaacag | ccccatcttt | 3060 |
| gtgattaaga | aaaggagcgg | caaattggaga | ctcctgcagg | acctgaggga | actcaacaag | 3120 |
| accgtccagg | tccggaactga | gatctctcgc | ggactgcctc | accccgccgg | cctgattaaa | 3180 |
| tgaagcaca | tgacagtcct | tgacattgga | gacgcttatt | ttaccatccc | cctcgatcct | 3240 |
| gaatttcgcc | ccataactgc | ttttaccatc | cccagcatca | atcaccagga | gcccagataa | 3300 |
| cgctatgtgt | ggaaagtcct | ccccagggga | tttgtgctta | gcccctacat | ttaccagga | 3360 |
| acacttcaag | agatcctcca | acctttccgc | gaaagatacc | cagagggttca | actctacca | 3420 |
| tatatggacg | acctgttcat | ggggtccaac | gggtctaaga | agcagcaca | ggaactcatc | 3480 |
| atcgaaactga | gggcaatcct | cctggagaaa | ggcttcgaga | cacccgacga | caagctgcaa | 3540 |
| gaagtctctc | catatagctg | gctgggctac | cagctttgcc | ctgaaaactg | gaaagtccag | 3600 |
| aagatgcagt | tggatatggt | caagaaccca | acactgaacg | acgtccagaa | gctcatgggc | 3660 |
| aatattacct | ggatgagctc | cggaaatccct | gggcttaccg | ttaagcacat | tggccgaact | 3720 |
| acaaaaggat | gcctggagtt | gcaccagaag | gctatttgg | cagagggaag | tcaggagaa | 3780 |
| ctggaggaga | ataatgaaaa | gattaagaat | gctcaagggc | tccaatacta | caatccgaa | 3840 |
| gaagaaatgt | tgtgcgaggt | cgaaatcact | aagaactacg | aagccaccta | tgtcatcaaa | 3900 |
| cagtcccaag | gcattctgtg | ggccggaaa | aaaatcatga | aggccaacaa | aggctggtcc | 3960 |
| accgttaaaa | atctgatgct | cctgctccag | cagctcgcca | ccgagtctat | cacccgcgtc | 4020 |
| ggcaagtgcc | ccaccttcaa | agttcccttc | actaaggagc | agggtgatgtg | ggagatgcaa | 4080 |
| aaaggctggt | actactcttg | gcttcccag | atcgtctaca | cccaccaagt | ggtgcacgac | 4140 |
| gactggagaa | tgaagcttgt | cgaggagccc | actagcggaa | ttacaatcta | taccgacggc | 4200 |
| ggaaagcaaa | acggagaggg | aatcgctgca | tacgtcacat | ctaacgycgc | caccaagcaa | 4260 |
| aagaggctcg | gcctgtcac | tcaccagggtg | gctgagagga | tggctatcca | gatggccctt | 4320 |
| gaggacacta | gagacaagca | ggtgaacatt | gtgactgaca | gctactactg | ctggaaaaac | 4380 |
| atcacagagg | gccttggcct | ggagggaacc | cagtctccct | ggtggcctat | catccagaat | 4440 |
| atccgcgaaa | aggaaattgt | ctatttccgc | tgggtgcctg | gacacaaagg | aatttacggc | 4500 |
| aaccaactcg | cogatgaagc | cgccaaaatt | aaagaggaaa | tcattgcttgc | ctaccagggc | 4560 |
| acacagatta | aggagaagag | agacgaggac | gctggctttg | acctgtgtgt | gccatagcac | 4620 |
| atcatgattc | ccgttagcga | cacaaagatc | attccaaacc | atgtcaagat | ccagggtgcca | 4680 |
| cccaattcat | ttgggtgggt | gaccggaaa | tccagcatgg | ctaagcaggg | tcttctgatt | 4740 |
| aacgggggaa | tcattgatga | aggatacacc | ggcgaaatcc | agggtgatctg | cacaaatctc | 4800 |
| ggcaaaagca | atattaagct | tatcgaagg | cagaagttcg | ctcaactcat | catcctccag | 4860 |
| caccacagca | attcaagaca | accttgggac | gaaaacaaga | ttagccagag | agggtgacaag | 4920 |
| ggcttcggca | gcacaggtgt | gttctgggtg | gagaaacatc | aggaagcaca | ggacgagcac | 4980 |
| gagaattggc | acacctcccc | taagattttg | gcccgaatt | acaagatccc | actgactgtg | 5040 |
| gctaagcaga | tcacacagga | atgcocccac | tgcaccaaac | aaggttctgg | ccccgcgggc | 5100 |
| tgcgtgatga | ggtcccccaa | tcactggcag | gcagattgca | cccacctcga | caacaaaatt | 5160 |
| atcctgacct | tcgtggagag | caattccggc | tacatccacg | caacactcct | ctccaaggaa | 5220 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| aatgcattgt | gcacctccct | cgcaattctg | gaatggggcca | ggctgtttctc | tccaaaatcc | 5280 |
| ctgcacaccg | acaacggcac | caacttttgt | gctgaacctg | tgggtgaatct | gctgaagttc | 5340 |
| ctgaaaatcg | cccacaccac | tggcattccc | tatcaccctg | aaagccaggg | cattgtcgag | 5400 |
| agggccaaca | gaactctgaa | agaaaagatc | caatctcaca | gagacaatac | acagacattg | 5460 |
| gaggccgcac | ttcagctcgc | ccttatcacc | tgcaacaaaag | gaagagaaaag | catggggcggc | 5520 |
| cagacccctt | gggaggtctt | catcactaac | caggcccagg | tcatccatga | aaagctgctc | 5580 |
| ttgcagcagg | cccagtcctc | caaaaagttc | tgtttttata | agatccccgg | tgagcacgac | 5640 |
| tggaaagggtc | ctacaagagt | tttgtggaaa | ggagacggcg | cagttgtggt | gaacgatgag | 5700 |
| ggcaaggggga | tcctcgtctg | gcccctgaca | cgcaccaagc | ttctcatcaa | gccaaactga | 5760 |
| acccgacgaa | tcccaggggg | aatctcaacc | cctattaccc | aacagtcaga | aaaatctaag | 5820 |
| tgtgaggaga | acacaatggt | tcaaccttat | tggtataata | atgacagtaa | gaacagcatg | 5880 |
| gcagaatcga | aggaagcaag | agaccaagaa | atgaacctga | aagaagaatc | taaagaagaa | 5940 |
| aaaagaagaa | atgactgggt | gaaaataggt | atgtttctgt | tatgcttagc | cagggccctc | 6000 |
| tggaaagggtg | ccagtgggtc | agggtcctcc | ggcagtcgtt | acctgaagaa | aaaattccat | 6060 |
| cacaaacatg | catcgcgaga | agacacctgg | gaccaggccc | aacacaacat | acacctagca | 6120 |
| ggcgtgaccg | gtggatcagg | ggacaaatac | tacaagcaga | agtactccag | gaacgactgg | 6180 |
| aatggagaat | cagaggagta | caacaggcgg | ccaaagagct | gggtgaagtc | aatcgaggca | 6240 |
| tttggagaga | gctatatttc | cgagaagacc | aaaggggaga | tttctcagcc | tggggcggct | 6300 |
| atcaacgagc | acaagaacgg | ctctgggggg | aacaatcctc | accaagggtc | cttagacctg | 6360 |
| gagattcgaa | gcgaaggagg | aaacatttat | gactgttgca | ttaaagccca | agaaggaact | 6420 |
| ctcgctatcc | cttgctgtgg | atttccctla | tggctatlll | gggggtcggg | gcggccgctt | 6480 |
| cccttttagtg | agggttaatg | cttcgagcag | acatgataag | atacattgat | gagtttgagc | 6540 |
| aaaccacaac | tagaatgcag | tgaaaaaaat | gctttatttg | tgaaatttgt | gatgctattg | 6600 |
| ctttattttgt | aaccattata | agctgcaata | caacaagttaa | caacaacaat | tgcattcatt | 6660 |
| ttatgttttca | ggttcagggg | gagatgtggg | aggtttttta | aagcaagtaa | aacctctaca | 6720 |
| aatgtggtaa | aatccgataa | ggatcgatcc | gggtggcgt | aatagcgaag | aggcccgcac | 6780 |
| cgatcgccct | tcccaacagt | tgcgagcct | gaatggcgaa | tggacgcgcc | ctgtagcggc | 6840 |
| gcattaagcg | cggcgggtgt | ggtggttaag | cgcagcgtga | ccgctacact | tgccagcgcc | 6900 |
| ctagcgcccg | ctcctttegc | tttcttccct | tcctttctcg | ccacgttcgc | cggctttccc | 6960 |
| cgtcaagctc | taaatcgggg | gctcccttta | gggttcgat | ttagagcttt | acggcacctc | 7020 |
| gaccgcaaaa | aacttgattt | gggtgatggg | tcacgtatgt | ggccatcgcc | ctgatagacg | 7080 |
| gttttttcgcc | ctttgacgtt | ggagtccacg | ttcttttaata | gtggactctt | gttccaaact | 7140 |
| ggaacaacac | tcaaccttat | ctcggtctat | tcttttgatt | tataagggat | tttgccgatt | 7200 |
| tccgcttatt | ggttaaaaaa | tgagctgatt | taacaaatat | ttaacgcgaa | ttttaacaaa | 7260 |
| atattaacgt | ttacaatttc | gcctgatgcg | gtattttctc | cttacgcctc | tgtgcggtat | 7320 |
| ttcacaccgc | atacgcggat | ctgcgcagca | ccatggcctg | aaataacctc | tgaaagagga | 7380 |
| acttggttag | gtaccttctg | aggcggaaaag | aaccagctgt | ggaatgtgtg | tcagttaggg | 7440 |
| tgtggaaaagt | cccagggctc | ccagcaggc | agaagtatgc | aaagcatgca | ttctaattag | 7500 |
| tcagcaacca | ggtgtggaaa | gtcccaggc | tcccagcag | gcagaagtat | gcaaagcatg | 7560 |
| catctcaatt | agtcagcaac | catagtcccg | cccctaactc | cgcctatccc | gcccctaact | 7620 |
| ccgcccagtt | ccgcccattc | tccgcccctt | ggctgactaa | ttttttttat | ttatgcagag | 7680 |
| gccgaggccg | cctcggcctc | tgagctattc | cagaagtagt | gaggaggctt | ttttggaggc | 7740 |
| ctaggctttt | gcaaaaagct | tgattcttct | gacacaacag | tctcgaaact | aaggctagag | 7800 |
| ccaccatgat | tgaacaagat | ggattgcacg | caggttctct | ggccgcttgg | gtggagaggc | 7860 |
| tattcggcta | tgactgggca | caacagacaa | tcggctgctc | tgatgcgcgc | gtgttcgggc | 7920 |
| tgtcagcgca | ggggcgcccg | gttctttttg | tcaagaccga | cctgtccggt | gcccgtaatg | 7980 |
| aactgcagga | cgaggcagcg | cggctatcgt | ggctggccac | gacggggcgt | ccttgccgag | 8040 |
| ctgtgtctga | cgttgtcact | gaagcgggaa | gggactggct | gctattgggc | gaagtgcggg | 8100 |
| ggcaggatct | cctgtcatct | caccttgctc | ctgccgagaa | agtatccatc | atggctgatg | 8160 |
| caatgcccgg | gctgcatacg | cttgatccgg | ctacctgcc | attcgaccac | caagcgaaac | 8220 |
| atcgcatcga | gcgagcacgt | actcggatgg | aagccggctc | tgtcgatcag | gatgatctgg | 8280 |
| acgaagagca | tcaggggctc | gcgccagccg | aactgttcgc | caggctcaag | gcgcgatgc | 8340 |
| ccgacggcga | ggatctcgtc | gtgacccatg | gcgatgcctg | cttgccgaat | atcatgggtg | 8400 |
| aaaatggccg | cttttcttga | ttcatcgact | gtggccggct | gggtgtggcg | gaccgctatc | 8460 |
| aggacatagc | gttggctacc | cgtgatattg | ctgaagagct | tggcggcgaa | tgggctgacc | 8520 |
| gcttcctcgt | gctttacggt | atcgccgctc | ccgattcgca | gcgcctcgcc | ttctatcgcc | 8580 |
| ttcttgacga | gttcttctga | gcgggactct | ggggttcgaa | atgaccgacc | aagcgacgcc | 8640 |
| caacctgcc | tcacgatggc | cgcaataaaa | tatctttatt | ttcattacat | ctgtgtgttg | 8700 |
| gttttttgtg | tcgaataagg | gcgataagga | tcgcgctatg | gtgcactctc | agtacaatc | 8760 |
| gctctgatgc | cgcatagtta | agccagcccc | gacacccgc | aacacccgct | gacgcgcct | 8820 |
| gacgggcttg | tctgctcccg | gcctccgctt | acagacaagc | tgtgaccgct | tccgggagct | 8880 |
| gcattgtgtca | gaggttttca | ccgtcatcac | cgaaacgcgc | gagacgaaag | ggcctcgtga | 8940 |
| tacgcctatt | tttatagggt | aatgtcatga | taataatggg | ttcttagacg | tcaggtggca | 9000 |
| cttttcgggg | aaatgtgcgc | ggaaccctta | tttgtttatt | ttctaaata | cattcaata | 9060 |

ES 2 618 508 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------|
| tgtatccgct | catgagacaa | taaccctgat | aaatgcttca | ataatattga | aaaaggaaga | 9120 |
| gtatgagtat | tcaacatttc | cgtgtcgccc | ttattccctt | ttttgcggca | ttttgccttc | 9180 |
| ctgtttttgc | tcaccacagaa | acgctgggtga | aagtaaaaga | tgctgaagat | cagttgggtg | 9240 |
| cacgagtggg | ttacatcgaa | ctggatctca | acagcggtaa | gatccttgag | agttttcgcc | 9300 |
| ccgaagaacg | ttttccaatg | atgagcactt | ttaaagtctt | gctatgtggc | gcggtattat | 9360 |
| cccgtattga | cgccgggcaa | gagcaactcg | gtcgccgcat | acactattct | cagaatgact | 9420 |
| tggttgagta | ctcaccagtc | acagaaaagc | atcttacgga | tggcatgaca | gtaagagaat | 9480 |
| tatgcagtgc | tgccataaacc | atgagtgata | acactgcggc | caacttactt | ctgacaacga | 9540 |
| tccgaggacc | gaaggagcta | accgcttttt | tgcacaacat | gggggatcat | gtaactcgcc | 9600 |
| ttgatcgttg | ggaaccggag | ctgaatgaag | ccataccaaa | cgacgagcgt | gacaccacga | 9660 |
| tgccgtgtagc | aatggcaaca | acgttgcgca | aactattaac | tggcgaacta | cttactctag | 9720 |
| cttcccggca | acaattaata | gactggatgg | aggcggataa | agttgcagga | ccacttctgc | 9780 |
| gctcggccct | tccggtggc | tggtttattg | ctgataaatc | tggagccggg | gagcgtgggt | 9840 |
| ctcgcggtat | cattgcagca | ctggggccag | atggtaagcc | ctcccgatc | gtagttatct | 9900 |
| acacgacggg | gagtcaggca | actatggatg | aacgaaatag | acagatcgct | gagataggtg | 9960 |
| cctcactgat | taagcattgg | taactgtcag | accaagttta | ctcatatata | ctttagattg | 10020 |
| atttaaaact | tcatttttta | tttaaaagga | tctaggtgaa | gatccttttt | gataatctca | 10080 |
| tgaccaaaat | cccttaacgt | gagttttcgt | tccactgagc | gtcagacccc | gtagaaaaga | 10140 |
| tcaaaggatc | ttcttgagat | cctttttttc | tgcgcgtaat | ctgctgcttg | caaacaaaaa | 10200 |
| aaccaccgct | accagcgggtg | gtttgtttgc | cggatcaaga | gctaccaact | ctttttccga | 10260 |
| aggtaactgg | cttcagcaga | gcgcagatac | caaatactgt | ccttctagt | tagccgtagt | 10320 |
| tagggcacca | cttcaagaac | tctgtagcac | cgcctacata | cctcgctctg | ctaactcctg | 10380 |
| taccagtggc | tgctgccagt | ggcgataagt | cgtgtcttac | cgggttggac | tcaagacgat | 10440 |
| agttaccgga | taaggcgcag | cggtcgggct | gaacgggggg | ttcgtgcaca | cagcccagct | 10500 |
| tgagagcaac | gacctacacc | gaactgagat | acctacagcg | tgagctatga | gaaagcgcca | 10560 |
| cgttcccga | agggagaaag | gcggacaggt | atccggtaag | cggcagggtc | ggaacaggag | 10620 |
| agcgcacgag | ggagcttcca | gggggaaacg | cctggtatct | ttatagtect | gtcgggtttc | 10680 |
| gccacctctg | acttgagcgt | cgatttttgt | gatgctcgtc | agggggggcg | agcctatgga | 10740 |
| aaaacgccag | caacgcggcc | tttttacggc | tectggcctt | ttgctggcct | tttgcctaca | 10800 |
| tggtcgcaca | gatct | | | | | 10815 |

<210> 8
 <211> 10930
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LpESYNGPRRE

<400> 8

ES 2 618 508 T3

```

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catabgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tcatttgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg ccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttccctactg 480
gcagtacatc tacgtattag tcacgtctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccgttgac gcaaagtggc ggtaggcgtg tacggtgagg ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac 780
agttaaattg ctaacgcagt cagtgtctct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840
gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggg actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcggttc tgataggcac ctattggctc tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020
aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080
ataggctaga gaattcgaga ggggcgcaga cctacctgt tgaacctggc tgatcgtagg 1140
atccccggga cagcagagga gaacttacag aagtcttctg gaggtgttcc tggccagAAC 1200
acaggaggac aggtaaagat ggcgatcccc tcacctgggc caaagccctg aagaaactgg 1260
aaaaagtcac cgttcagggg agccaaaagc ttaccacagg caattgcaac tgggcattgt 1320
ccctggtgga tcttttccac gacactaatt tcgttaagga gaaagattgg caactcagag 1380

```



```

acgtgatccc cctcttggag gacgtgaccc aaacattgtc tgggcaggag cgcgaagcct 1440
tcgagcgcac ctggtgggccc atcagcgcag tcaaaatggg gctgcaaata aacaacgtgg 1500
ttgacggtaa agctagcttt caactgctcc gcgctaagta cgagaagaaa accgcccaaca 1560
agaaacaatc cgaacctagc gaggagtacc caattatgat cgacggcgcc ggcaatagga 1620
acttcgccc actgactccc aggggtata ccacctgggt caacaccatc cagacaaacg 1680
gacttttgaa cgaagcctcc cagaacctgt tcggcatcct gtctgtggac tgcacctccg 1740
aagaaatgaa tgcttttctc gacgtggtgc caggacagggc tggacagaaa cagatcctgc 1800
tcgatgccat tgacaagatc gccgacgact gggataatcg ccacccctcg ccaaaccgcc 1860
ctctgggtggc tccccacacg gggcctatcc ctatgaaccg taggttcatt aggggactgg 1920
gggtgccccg cgaacgccag atggagccag catttgacca atttaggcag acctacagac 1980
agtggatcat cgaagccatg agcaggggga ttaaatgcat gatcggaaag cccaaggcac 2040
agaacatcat gcagggggcg aaggaacctt accctgagtt tgtcgacagg ctctgtccc 2100
agattaaatc cgaaggccac cctcaggaga tctccaagtt ctgacagag acactgacta 2160
tccaaaatgc aaatgaagag tgcagaaacg ccatgaggca cctcagacct gaagataccc 2220
tggaggagaa aatgtacgca tgtcgcgaca ttggcactac caagcaaaag atgatgctgc 2280
tcgccaaggc tctgcaaacc ggccctggctg gtccattcaa aggaggagca ctgaaggggag 2340
gtccattgaa agctgcacaa acatgttata attgtgggaa gccaggacat ttatctagtc 2400
aatgtagagc acctaaagtc tgttttaaat gtaaacagcc tggacatttc tcaaagcaat 2460
gcagaatgtg tccaaaaaac gggagcaagc gggctcaagg gaggccccc aaacaaactt 2520
tcccgatata acagaagagt cagcacaaca aatctgttgt acaagagact cctcagactc 2580
aaaaatctga cccagatctg agcgaataaa aaaaggaata caatgtcaag gagaaggatc 2640
aagtagagga tctcaacctg gacagtttgt gggagtaaca tacaatctcg agaagaggcc 2700
cactaccatc gtccctgatc atgacacccc tcttaatgtg ctgctggaca ccggagccga 2760
caccagcgtt ctcaactactg ctcactataa cagactgaaa tacagaggaa ggaaatacca 2820
gggcacaggc atcatcgccg ttggaggcaa cgtcgaaacc tttccactc ctgtcaccat 2880
caaaaagaag gggagacaca ttaaaaccag aatgctggtc gccgacatcc ccgtcaccat 2940
ccttggcaga gacattctcc aggacctggg cgctaaactc gtgctggcac aactgtctaa 3000
ggaaatcaag ttccgcaaga tcgagctgaa agagggcaca atgggtccaa aaatccccc 3060
gtggccctcg accaaagaga agcttgaggc cgctaaggaa atcgtgcagc gcctgcttcc 3120
tgagggcaag attagcgagg ccagcgacaa taacccttac aacagcccca tctttgtgat 3180
taagaaaagg agcggcaaat ggagactcct gcaggacctg agggaaactc acaagaccgt 3240
ccaggtcgga actgagatct ctgcggactc gcctcaccce ggccgctga ttaaagcaa 3300
gcacatgaca gtccctgaca ttggagacgc ttattttacc atcccctcg atcctgaatt 3360
tcgcccctat actgctttta ccatcccag catcaatcac caggagcccg ataaacgcta 3420
tgtgtggaag tgccctcccc agggatttgt gcttagcccc tacatttacc agaagacact 3480
tcaagagatc ctccaacctt tccgcgaaag ataccagag gttcaactct accaatatat 3540
ggacgaacctg ttcatggggt ccaacgggtc taagaagcag cacaaggaaac tcatcatcga 3600
actgagggca atcctcctgg agaaaggctt cgagacaccc gacgacaagc tgcaagaagt 3660
tctccatata agctggctgg gctaccagct ttgccctgaa aactggaaag tccagaagat 3720
gcagttggat atggtcaaga acccaacact cagaaagctc agggcaatat 3780
tacctggatg agctccggaa tccctgggct taccgttaag cacattgccg caactacaaa 3840
aggatgcctg gagttgaacc agaaggtcat ttggacagag gaagctcaga aggaactgga 3900
ggagaataat gaaaagatta agaatgtcga agggctccaa tactacaatc ccgaagaaga 3960
aatgttgtgc gaggtcgaaa tcaactaagaa ctacgaagcc acctatgtca tcaaacagtc 4020
ccaaggcatc ttgtgggccc ttgtgggccc aatgaaggcc aacaaaggct ggtccaccgt 4080
taaaaatctg atgctcctgc tccagcacgt cgccaccgag tctatcaccc gcgtcgga 4140
gtgccccacc ttcaaagttc ccttcactaa ggagcaggtg atgtgggaga tgcaaaaagg 4200
ctggtactac tcttggett cccagatcgt ctacacccac caagtgggtc acgacgactg 4260
gagaatgaag cttgtcgagg agcccaactag cggaaattaca atctataccg acggcgga 4320
gcaaaacgga gagggaaatc ctgcatacgt cacatctaac ggccgcacca agcaaaagag 4380
gctcggccct gtcactcacc aggtggctga gaggatggct atccagatgg cocttgagga 4440
cactagagac aagcaggtga acattgtgac tgacagctac tactgctgga aaaacatcac 4500
agagggcctt ggccctggagg gacccagtc tccctgggtg cetatcatcc agaataatcc 4560
cgaaaagtaa atgtctatt tcgctgggt cctggacac aaaggaaatt acggcaacca 4620
actcgcgat gaagccgcca aaattaaaga ggaaatcatg cttgcctacc agggcacaca 4680
gattaaggag aagagagacg aggacgctgg ctttgacctg tgtgtgcat acgacatcat 4740
gattccggtt agcgacacaa agatcattcc aaccgatgtc aagatccagg tgccacccaa 4800
ttcatttgtt tgggtgaccg gaaagtccag catggctaag cagggctctc tgattaacgg 4860
gggaatcatt gatgaaggat acaccggcga aatccagggt atctgcacaa atatcgga 4920
aagcaatatt aagcttatcg aagggcagaa gttcgctcaa ctcatcatcc tccagcaca 4980
cagcaattca agacaacctt gggacgaaaa caagattagc cagagaggtg acaagggctt 5040
cggcagcaca ggtgtgttct ggggtggagaa catccaggaa gcacaggacg agcacgagaa 5100
ttggcacacc tcccctaaga ttttggccc caattacaag atcccactga ctgtggctaa 5160
gcagatcaca caggaatgcc cccactgcac caaacaaggt tctggccccg ccgctgcgt 5220

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|------|
| gatgaggtcc | cccaatcact | ggcaggcaga | ttgcacccac | ctcgacaaca | aaattatcct | 5280 |
| gaccttcgtg | gagagcaatt | ccggctacat | ccacgcgaaca | ctcctctcca | aggaaaaatgc | 5340 |
| atttgtgcacc | tccctcgcaa | ttcttggaaatg | ggccaggctg | ttctctccaa | aatccctgca | 5400 |
| caccgacaac | ggcaccaact | ttgtggctga | acctgtgggtg | aatctgctga | agttcctgaa | 5460 |
| aategcccac | accactggca | ttccctatca | ccctgaaagc | cagggcattg | tcgagagggc | 5520 |
| caacagaact | ctgaaagaaa | agatccaatc | tcacagagac | aatacacaga | cattggaggc | 5580 |
| cgcacttcag | ctcgccctta | tcacctgcaa | caaagggaaga | gaaagcatgg | gcgggccagac | 5640 |
| ccccggggag | gtcttcatca | ctaaccaggc | ccaggctcatc | catgaaaagc | tgctcttgca | 5700 |
| gcaggcccag | tcttccaaaa | agttctgctt | ttataagatc | cccgtgagc | accactggaa | 5760 |
| aggtoctaca | agagttttgt | ggaaaggaga | cggcgagtt | gtggtgaacg | atgagggcaa | 5820 |
| ggggatcatc | gctgtgcccc | tgacacgcac | caagcttctc | atcaagccaa | actgaacccg | 5880 |
| acgaatccca | gggggaatct | caacccctat | tacccaacag | tcagaaaaat | ctaagtgtga | 5940 |
| ggagaacaca | atgtttcaac | cttattgtta | taataatgac | agtaagaaca | gcatggcaga | 6000 |
| atcgaaggaa | gcaagagacc | aagaaatgaa | cctgaaagaa | gaatctaaag | aagaaaaaag | 6060 |
| aagaaatgac | tggtggaaaa | taggtatggt | tctgttatgc | ttagccaggg | ccctctggaa | 6120 |
| ggtgaccagg | ggtgcagggt | cctccggcag | tcgttacctg | aagaaaaaat | tccatcacaa | 6180 |
| acatgcatcg | cgagaagaca | cctgggacca | ggcccaacac | aacatacacc | tagcaggcgt | 6240 |
| gaccgggtga | tcagggggaca | aatactacaa | gcagaagtac | tccaggaacg | actggaatgg | 6300 |
| agaatcagag | gagtacaaca | ggcggccaaa | gagctgggtg | aagtcaatcg | aggcatttgg | 6360 |
| agagagctat | atttccgaga | agaccaaagg | ggagatttct | cagcctgggg | cggctatcaa | 6420 |
| cgagcacaag | aacggctctg | gggggaacaa | tctcaccaa | gggtccttag | acctggagat | 6480 |
| tcgaagcgaa | ggaggaaaaca | tttatgactg | ttgcattaaa | gcccaagaag | gaactctcgc | 6540 |
| tatcccttgc | tgtggatttc | ccttatggct | attttggggg | tcggggcggc | cgcttccctt | 6600 |
| tagtgagggt | taatgcttcg | agcagacatg | ataagataca | ttgatgagtt | tggacaaacc | 6660 |
| acaactagaa | tgcaagtga | aaaatgcttt | atttgtgaaa | tttgtgatgc | tattgcttta | 6720 |
| tttgtaaaca | ttataagctg | caataaaca | gttaacaaca | acaattgcat | tcattttatg | 6780 |
| tttcagggttc | agggggagat | gtgggaggtt | ttttaagca | agtaaaacct | ctacaaatgt | 6840 |
| ggtaaaatcc | gataaggatc | gatccgggct | ggcgtaatag | cgaagaggcc | cgcaccgatc | 6900 |
| gcccctccca | acagttgcgc | agcctgaatg | gcgaatggac | gcgccttgta | gcggcgcatt | 6960 |
| aagcgcggcg | ggtgtgggtg | ttacgcgcag | cgtgcgcgt | acacttgcca | gcgccttagc | 7020 |
| gcccgcctct | ttcgtttctt | tcccttccct | tctgcgcacg | ttcgcgcgct | ttcccgcgtc | 7080 |
| agctctaaat | cgggggctcc | ctttagggtt | ccgatttaga | gctttacggc | acctcgaccg | 7140 |
| caaaaaactt | gattttgggtg | atggttcacg | tagtgggcca | tcgccttgat | agacgggtttt | 7200 |
| tcgcctcttg | acgttggagt | ccacgttctt | taatagtggg | ctcttggttc | aaactgggac | 7260 |
| aacactcaac | cctatctcgg | tctattcttt | tgatttataa | gggattttgc | cgaatttcggc | 7320 |
| ctattgggta | aaaaatgagc | tgattttaaca | aatatttaac | gcgaatttta | acaaaatatt | 7380 |
| aaegtittaca | atttcgcctg | atgcggtatt | ttctccttac | gcatctgtgc | ggattttcac | 7440 |
| accgcatacg | cggatctgcg | cagcaccatg | gcctgaaata | acctctgaaa | gaggaaccttg | 7500 |
| gttagggtacc | ttctgaggcg | gaaagaacca | gctgtggaat | gtgtgtcagt | taggggtgtgg | 7560 |
| aaagtcccca | ggctccccag | caggcagaag | tatgcaaagc | atgcatctca | attagtcaag | 7620 |
| aaccagggtg | ggaaagtccc | caggctcccc | agcaggcaga | agtatgcaaa | gcatgcatct | 7680 |
| caattagtca | gcaaccatag | tcccgcctct | aactccgccc | atcccgcctc | taactccgcc | 7740 |
| cagttcccg | cattctccgc | cccatggctg | actaattttt | tttatttatg | cagaggccga | 7800 |
| ggcgcctctg | gcctctgagc | tattccagaa | gtagtggga | ggcttttttg | gagggctagg | 7860 |
| cttttgcaaa | aagcttgatt | cttctgacac | aacagtctcg | aacttaaggc | tagagccacc | 7920 |
| atgattgaac | aagatggatt | gcacgcagg | tctccggccg | cttgggtgga | gaggctattc | 7980 |
| ggctatgact | gggcacaaca | gacaatcggc | tgctctgatg | ccgcctgtgt | ccggctgtca | 8040 |
| gcgcaggggc | gcccgggtct | ttttgtcaag | accgacctgt | ccggtgcctt | gaatgaactg | 8100 |
| caggacgagg | cagcgcgggt | atcgtggctg | gccacgaagg | gcgttccttg | cgcagctgtg | 8160 |
| ctcgacgttg | tcaactgaagc | gggaagggac | tggtgctat | tgggcgaagt | gcccgggcag | 8220 |
| gatctcctgt | catctcacct | tgctcctgcc | gagaaagtat | ccatcatggc | tgatgcaatg | 8280 |
| cggcggtctg | atacgtttga | tccggtacc | tgcccattcg | accaccaagc | gaaacatcgc | 8340 |
| atcgagcgag | cacgtactcg | gatggaagcc | ggtcttgtcg | atcaggatga | tctggacgaa | 8400 |
| gagcatcagg | ggctcgcgc | agccgaactg | ttcgccaggc | tcaaggcgcg | catgcccagc | 8460 |
| ggcgagggatc | tcgtcgtgac | ccatggcgat | gcctgcttgc | cgaatatcat | ggtggaaaaat | 8520 |
| ggccgctttt | ctggattcat | cgactgtggc | cggctgggtg | tggcggaccg | ctatcaggac | 8580 |
| atagcgttgg | ctacccgtga | tattgctgaa | gagcttggcg | gcgaatgggc | tgaccgcttc | 8640 |
| ctcgtgcttt | acggtatcgc | cgtccccgat | tcgcagcgca | tcgccttcta | tcgccttctt | 8700 |
| gacgagttct | tctgagcggt | actctgggtt | tcgaaatgac | cgaccaagcg | acgccccacc | 8760 |
| tgccatcacg | atggccgcaa | taaaatatct | ttattttcat | tacatctgtg | tgtttggttt | 8820 |
| ttgtgtgaat | cgatagcgat | aaggatccgc | gtatgggtga | ctctcagtac | aatctgctct | 8880 |
| gatgcgcgat | agttaagcca | gccccgacac | ccgcacaacac | ccgctgacgc | gcccgtacgg | 8940 |
| gcttgtctgc | tcccggcact | cgttacaga | caagctgtga | cgtctccgg | gagctgcagt | 9000 |
| tgtcagaggt | tttcacccgc | atcaccgaaa | cgcgcgagac | gaaagggcct | cgtgatacgc | 9060 |

```

ctatTTTTat aggttaatgt catgataata atggttttctt agacgtcagg tggcactttt 9120
cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacattc aaatatgtat 9180
ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 9240
agtattcaac atttccgtgt cgcctttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttctgtt 9300
tttgcctacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 9360
gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa 9420
gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt 9480
attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt 9540
gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 9600
agtgcctcca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga 9660
ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 9720
cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaaccgac agcgtgacac cagcatgcct 9780
gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc 9840
cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg 9900
gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc 9960
gggtacattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg 10020
acgggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 10080
ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 10140
aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc 10200
aaaatccctt aacgtgagtt ttogttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 10260
ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 10320
ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta 10380
actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggg 10440
caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca 10500
gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta 10560
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag 10620
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgcacgctt 10680
cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc 10740
acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac 10800
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 10860
gccagcaacg cggccttttt acggttctctg gccttttgcg ggccttttgc tcacatggct 10920
cgacagatct                                     10930

```

<210> 9
 <211> 11131
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY4.0Z

<400> 9

ES 2 618 508 T3

```

ctaaattgta agcggttaata ttttggttaaa attcgcgtta aatttttggtt aaatcagctc 60
atTTTTtaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtgttggtc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtgggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacaagt tttttggggt cgaggtgocg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag 300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc aacctggctt atcgaaatta atacgactca 360
ctataggag agccgcagat cttgaataat aaaatgtgtg tttgtccgaa atacgcgttt 420
tgagatttct gtcgccgact aaattcatgt cgcgcgatag tgggtgtttat cgcgcgataga 480
gatggcgata ttggaaaaat tgatatttga aaatatggca tattgaaaat gtcgccgatg 540
tgagtttctg tgtaactgat atcgccattt ttccaaaagt gatttttggg catacgcgat 600
atctggcgat agcgcttata tcgtttacgg gggatggcga tagacgactt tggtgacttg 660
ggcgattctg tgtgtcgcaa atatcgcagt ttcgatatag gtgacagacg atatgaggct 720
atatcgccga tagaggcgac atcaagctgg cacatggcca atgcataatcg atctatacat 780
tgaatcaata ttggccatta gccatattat tcattgggtt tatagcataa atcaatatgt 840
gctattggcc attgcatacg ttgtatccat atcgtaatat gtacatttat attggctcat 900
gtccaacatt accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta 960
cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg 1020
gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gcccatggac gtcaataatg acgtatgttc 1080
ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa 1140
ctgccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tccgccccct attgacgtca 1200
atgacggtaa atggeccgce tggcattatg ccagtlacat gaccttacgg gactttccta 1260

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cttggcagta | catctacgta | ttagtcacgt | ctattaccat | ggtgatgcgg | ttttggcagt | 1320 |
| acaccaatgg | gcgtggatag | cggtttgact | cacggggatt | tccaagtctc | caccccatg | 1380 |
| acgtcaatgg | gagtttggtt | tggcaccaaa | atcaacggga | ctttccaaaa | tgtcgtaaca | 1440 |
| actgcgatcg | ccgcgcccg | tgaocgcaaat | gggcggtagg | cgtgtacggg | gggaggtcta | 1500 |
| tataagcaga | gctcgtttag | tgaaccgggc | actcagattc | tgcggctctga | gtcccttctc | 1560 |
| tgcgtggctg | aaaaggcctt | tgtataaat | ataattctct | actcagtcoc | tgtctctagt | 1620 |
| ttgtctgttc | gagatccctac | agttggcgcc | cgaacaggga | cctgagaggg | gcgcagaccc | 1680 |
| tacctgttga | acctggctga | tcgtaggata | ccggggacag | cagaggagaa | cttacagaag | 1740 |
| tcttctggag | gtgttcctgg | ccagaacaca | ggaggacagg | taagatggga | gaccttttga | 1800 |
| catggagcaa | ggcgctcaag | aagtttagaga | aggtgacgg | acaagggtct | cagaaattaa | 1860 |
| ctactggtaa | ctgtaattgg | gcgctaagtc | tagtagactt | atttcatgat | accaactttg | 1920 |
| taaaagaaaa | ggactggcag | ctgagggatg | tcattccatt | gctggaagat | gtaactcaga | 1980 |
| cgtgtcagg | acaagaaaga | gaggcctttg | aaagaacatg | gtgggcaatt | tctgctgtaa | 2040 |
| agatgggct | ccagattaat | aatgtagtag | atggaaaggg | atcattccag | ctcctaagag | 2100 |
| cgaatatga | aaagaagact | gctaataaaa | agcagtctga | gccctctgaa | gaatatctct | 2160 |
| agaactagt | gataccccgg | gctgcaggag | tggggaggca | cgatggcccg | tttggctcag | 2220 |
| gcggatccgg | ccattagcca | tattattcat | tgggtatata | gcataaatca | atattggcta | 2280 |
| ttggccattg | catacgttgt | atccatatca | taatatgtac | atttatattg | gctcatgtcc | 2340 |
| aacattaccg | ccatgttgac | attgattatt | gactagttat | taatagtaat | caattacggg | 2400 |
| gtcattagtt | catagcccat | atatggagtt | ccgcgttaca | taacttacgg | taaatggccc | 2460 |
| gctggctga | ccgcccaacg | acccccggcc | attgacgtca | ataatgacgt | atgttcccat | 2520 |
| agtaacgcca | atagggactt | tccattgacg | tcaatgggtg | gagtatttac | ggtaaaactgc | 2580 |
| ccacttggca | gtacatcaag | tgtatcatat | gccaaagtac | ccccctattg | acgtcaatga | 2640 |
| ccgtaaatgg | ccgcctggc | attatgccc | gtacatgacc | ttatgggact | ttcctacttg | 2700 |
| gcagtacatc | tacgtattag | tcacgtctat | taccatgggtg | atgcgggttt | ggcagtacat | 2760 |
| caatgggctg | ggatagcgg | ttgactcaacg | gggatttcca | agtctccacc | ccattgacgt | 2820 |
| caatgggagt | ttgttttggc | acaaaaatca | acgggacttt | ccaaaatgtc | gtaacaactc | 2880 |
| cgcctcatg | acgcaaatgg | gcggtaggca | tgtacgggtg | gaggtctata | taagcagagc | 2940 |
| togttagtg | aaccgtcaga | tgcctggag | acgccatcca | cgtgtttttg | acctccatag | 3000 |
| aagacacgg | gaccgatcca | gcctccggcg | ccccaaagct | cagctgctga | aggatctcgc | 3060 |
| gatccgggga | attccccagt | ctcaggatcc | accatggggg | atcccgctct | tttacaacgt | 3120 |
| cgtgactggg | aaaaccctgg | cgttacccaa | cttaatcgcc | ttgcagcaca | ttcccccttc | 3180 |
| gccagctggc | gtaatagcga | agaggccggc | accgatcgcc | cttcccaaca | gttgccgagc | 3240 |
| ctgaatggcg | aatggcgctt | tgcctgggtt | ccggcaccag | aagcgggtgc | ggaaagctgg | 3300 |
| ctggagtgcg | atcttctctga | ggccgatact | gtcgtcgtcc | cctcaaaactg | gcagatgcac | 3360 |
| ggttacgatg | cgcctcatcta | caccaacgta | acctatccca | ttacgggtcaa | tccgcggttt | 3420 |
| gttcccacgg | agaatccgac | gggttgtttac | tccgtcacat | ttaatgttga | tgaagctgg | 3480 |
| ctacaggaag | gccagacggc | aattattttt | gatggcggtta | actcggcggt | tcatctgtgg | 3540 |
| tgcacggggc | gctgggtcgg | ttacggccag | gacagtctgt | tgcgtctga | atttgacctg | 3600 |
| agcgcatttl | tacgcgcggg | agaaaaccgc | ctcgcgggtga | tgggtctgcg | ttggagtgc | 3660 |
| ggcagttatc | tggaaagatca | ggatatgtgg | cggatgagcg | gcattttccg | tgacgtctcg | 3720 |
| ttgctgcata | aaccgactac | acaaatcagc | gatttcccatg | ttgccactcg | ctttaatgat | 3780 |
| gatttcagcc | gcgtgtact | ggaggctgaa | gttcagatgt | gcggcgaggt | gcgtgactac | 3840 |
| ctacgggttaa | cagtttcttt | atggcagggg | gaaacgcagg | tccgcagcgt | caccgcgct | 3900 |
| ttcggcggtg | aaattatcga | tgagcgtgg | ggttatgccc | atcgcgtcac | actacgtctg | 3960 |
| aacgtcgaaa | acccgaaact | gtggagcgcc | gaaatcccg | atctctatcg | tgcgggtggt | 4020 |
| gaactgcaca | ccgcgcagcg | cacgctgatt | gaagcagaag | cctgcgatgt | cgggttccgc | 4080 |
| gaggtgcgga | ttgaaaatgg | tctgctgctg | ctgaacggca | agccgttgct | gattcagagg | 4140 |
| gttaaccgtc | acgagcatca | tcctctgcat | ggtcaggtea | tggatgagca | gacgatgggt | 4200 |
| caggatatcc | tgtgatgaa | gcagaacac | tttaacgcgc | tgcgtgtttc | gcattatccg | 4260 |
| aacctatccg | tgtgttacac | gctgtgcgac | cgctacggcc | tgtatgtggt | ggatgaagcc | 4320 |
| aatattgaaa | cccacggcat | ggtgccaatg | aatcgtctga | ccgatgatcc | gcgctggcta | 4380 |
| ccggcgatga | gcgaacgcgt | aacgcgaatg | gtgcagcgcg | atcgtaatca | cccgagtgtg | 4440 |
| atcatctggt | cgttggggaa | tgaatcaggc | cacggcgcta | atcacgacgc | gctgtatcgc | 4500 |
| tggatcaaat | ctgtcgatcc | ttcccgcccg | gtgcagtatg | aaggcggcgg | agccgacacc | 4560 |
| acggccaccg | atattattttg | cccgatgtac | gcgcgcgtgg | atgaagacca | gcccttcccg | 4620 |
| gctgtgcga | aatggcccat | caaaaaatgg | ctttcgctac | ctggagagac | gcgcgcgctg | 4680 |
| atccttttgc | aatacggcca | cgcgatgggt | aacagtcttg | gcgggttccg | taataactgg | 4740 |
| caggcggttc | gtcagtatcc | ccgtttacag | ggcggttccg | tctgggactg | ggtggatcag | 4800 |
| tgcgtgatta | aatatgatga | aaacggcaac | ccgtgggtcg | cttacggcgg | tgatttttggc | 4860 |
| gatacgcga | acgatcgcca | gttctgtatg | aacggtctgg | tcttttgcga | ccgcacgcgc | 4920 |
| catccagcgc | tgacggaagc | aaaacaccag | cagcagtttt | tccagttccg | tttatccggg | 4980 |
| caaaccatcg | aagtgaccag | cgaataacctg | ttccgtcata | gcgataacga | gctcctgcac | 5040 |
| tggatggtgg | cgtggatgg | taagccgctg | gcaagcgggtg | aagtgcctct | ggatgtcgtc | 5100 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ccacaaggta | aacagttgat | tgaactgcct | gaactadccg | agccggagag | cgccgggcaa | 5160 |
| ctctggctca | cagtaacgct | agtgcacccg | aacgcgaccc | catggtcaga | agccggggcac | 5220 |
| atcagcgcc | ggcagcagtg | gcgtctggcg | gaaaacctca | gtgtgacgct | ccccgcgcgc | 5280 |
| tcccacgcca | tcccgcattc | gaccaccagc | gaaatggatt | tttgcacga | gctgggtaat | 5340 |
| aagcgttggc | aatttaaccg | ccagtcaggc | tttctttcac | agatgtggat | tggcgataaa | 5400 |
| aaacaactgc | tgacgcgcgt | gcgcgatcag | ttcacccgtg | caccgctgga | taacgacatt | 5460 |
| ggcgttaagt | aagcgacccg | cattgaccct | aacgcctggg | tcgaacgctg | gaaggcggcg | 5520 |
| ggccattacc | agggcgaagc | agcgttgttg | cagtgcacgg | cagatacaact | tgctgatgcg | 5580 |
| gtgctgatta | cgaccgctca | cgcgtggcag | catcagggga | aaaccttatt | tatcagcccg | 5640 |
| aaaacctacc | ggattgatgg | tagtgggtcaa | atggcgatta | ccgttgatgt | tgaagtggcg | 5700 |
| agcgataacc | cgcatccggc | gcggattggc | ctgaactgcc | agctggcgca | ggtagcagag | 5760 |
| cgggtaaaact | gcctcggatt | agggccgcaa | gaaaactatc | ccgaccgcct | tactgcgcgc | 5820 |
| tgttttgacc | gctgggatct | gccattgtca | gacatgtata | ccccgtacgt | cttcccgagc | 5880 |
| gaaaacggtc | tgcgctgcgg | gacgcgcgaa | ttgaattatg | gcccacacca | gtggcgcggc | 5940 |
| gacttccagt | tcaacatcag | ccgctacagt | caacagcaac | tgatggaaac | cagccatcgc | 6000 |
| catctgctgc | acgcggaaga | aggcacatgg | ctgaatatcg | acggtttcca | tatggggatt | 6060 |
| ggtggcgacg | actcctggag | cccgtcagta | tcggcggaat | tccagctgag | cgccggtcgc | 6120 |
| taccattacc | agttgggtctg | gtgtcaaaaa | taataataac | cgggcagggg | ggatccgcag | 6180 |
| atccggctgt | ggaatgtgtg | tcagttaggg | tgtggaaagt | ccccaggctc | cccagcagcg | 6240 |
| agaagtatgc | aaagcatgcc | tgcaggaatt | cgatatcaag | cttatcgata | ccgtcgacct | 6300 |
| cgaggggggg | cccggtaccc | agcttttgtt | cccttttagtg | agggttaatt | gcgcgggaag | 6360 |
| tatttatcac | taatcaagca | caagtaatac | atgagaaact | tttactacag | caagcacaat | 6420 |
| cctccaaaaa | attttgtttt | tacaaaatcc | ctggtgaaca | tgattggaag | ggacctacta | 6480 |
| gggtgctgtg | gaaggggtgat | ggtgcagtag | tagttaatga | tgaaggaaaag | ggaataattg | 6540 |
| ctgtaccatt | aaccaggact | aagttactaa | taaaaccaa | ttgagtattg | ttgcagggaag | 6600 |
| caagacccaa | ctaccattgt | cagctgtgtt | tccagaggtc | tctagggaatt | gattacctcg | 6660 |
| atgcttcatt | aaggaagaag | aataaacaaa | gactgaaggc | aatccaacaa | ggaagacaac | 6720 |
| ctcaatattt | gttataagggt | ttgatatatg | ggagtatttg | gtaaaggggt | aacatgggtca | 6780 |
| gcctgcgcat | ctatggggga | atcccagggg | gaatctcaac | ccctattacc | caacagtcag | 6840 |
| aaaaatctaa | gtgtgaggag | aacacaatgt | ttcaacctta | ttgtttataat | aatgacagta | 6900 |
| agaacagcat | ggcagaatcg | aaggaagcaa | gagaccaaga | aatgaacctg | aaagaagaat | 6960 |
| ctaaagaaga | aaaaagaaga | aatgactggg | ggaaaatagg | tatgtttctg | ttatgcttag | 7020 |
| caggaaactac | tggaggaata | ctttgggtgt | atgaaggact | cccacagcaa | cattatatag | 7080 |
| ggttgggtgg | gataggggga | agattaaacg | gatctggcca | atcaaagtct | atagaatgct | 7140 |
| gggggttcc | cccggggtgt | agaccatttc | aaaattactt | cagttatgag | accaatagaa | 7200 |
| gcctgcctat | ggataataat | actgctacat | tattagaagc | tttaaccaat | ataactgctc | 7260 |
| tataaataac | aaaacagaat | tagaaacatg | gaagttagta | aagacttctg | gcataactcc | 7320 |
| tttacctatt | tcttctgaag | ctaacactgg | actaattaga | cataagagag | attttgggtat | 7380 |
| aagtgcataa | gtggcagcta | ttgtagccgc | tactgctatt | gctgctagcg | ctactatgct | 7440 |
| ttatgttgct | ctaaactgag | tttaacaaat | aatgaagta | caaaatcata | cttttgaggt | 7500 |
| agaaaatagt | actctaaatg | gtatggattt | aatagaacga | caaataaaga | tattatatgc | 7560 |
| tatgattctt | caaacacatg | cagatgttca | actgtttaaag | gaaagacaac | aggtagagga | 7620 |
| gacattttaat | ttaattggat | gtatagaaag | aacacatgta | ttttgtcata | ctggtcatcc | 7680 |
| ctggaatatg | tcatggggac | atttaaatga | gtcaacacaa | tgggatgact | gggtaaagcaa | 7740 |
| aatggaagat | ttaaatcaag | agataactaac | tacacttcat | ggagccagga | acaatttggc | 7800 |
| acaatccatg | ataacattca | atacaccaga | tagtatagct | caatttggaa | aagacctttg | 7860 |
| gagtcataatt | ggaaattgga | ttcctggatt | gggagcttcc | attataaaat | atatagtgat | 7920 |
| gtttttgctt | atltattttgt | tactaacctc | ttcgccctaag | atcctcaggg | ccctctggaa | 7980 |
| ggtgaccagt | ggtgcagggt | cctccggcag | tcgttacctg | aagaaaaaat | tccatcacaa | 8040 |
| acatgcctcg | cgagaagaca | cctgggacca | ggcccaacac | aacatacacc | tagcaggcgt | 8100 |
| gaccgggtgga | tcagggggaca | aatactacaa | gcagaagtac | tccagggaacg | actggaatgg | 8160 |
| agaatcagag | gagtacaaca | ggcgcccaaa | gagctgggtg | aagtcaatcg | aggcattttgg | 8220 |
| agagagctat | atltccgaga | agaccaaagg | ggagatttct | cagcctgggg | cggctatcaa | 8280 |
| cgagcacaaag | aacggctctg | gggggaacaa | tcttcaccaa | gggtccttag | acctggagat | 8340 |
| tcgaagcgaa | ggaggaaaca | tttatgactg | ttgcattaaa | gcccagaag | gaactctcgc | 8400 |
| tatcccttgc | tgtggatttc | ccttatggct | atlttggggg | ctagtaatta | tagtaggacg | 8460 |
| catagcaggc | lalggattac | gtggactcgc | tgttataata | aggatttcta | ttagaggctt | 8520 |
| aaatttgata | tttgaaataa | tcagaaaaat | gcttgattat | attggaagag | ctttaaatcc | 8580 |
| tggcacatct | catgtatcaa | tgcctcagta | tgtttagaaa | aacaaggggg | gaactgtggg | 8640 |
| gtttttatga | ggggttttat | aaatgattat | aagagtataa | agaaagtgc | tgatgctctc | 8700 |
| ataacctttgt | ataacccaaa | ggactagctc | atgttgctag | gcaactaaac | cgcaataacc | 8760 |
| gcattttgtga | cgcgagttcc | ccatttggtga | cgcgttaact | tcctgttttt | acagtatata | 8820 |
| agtgccttga | ttctgacaa | tgggcactca | gattctgcgg | tctgagtcct | ttctctgctg | 8880 |
| ggctgaaaag | gcctttgtta | taaatataat | tctctactca | gtccctgtct | ctaglttctc | 8940 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------|
| tgttcgagat | cctacagagc | tcattgccttg | gcgtaatcat | ggtcatagct | gtttcctgtg | 9000 |
| tgaaattgtt | atccgctcac | aattccacac | aacatacgag | ccggaagcat | aaagtgtaaa | 9060 |
| gcctgggggtg | cctaattgagt | gagctaactc | acattaattg | cgttgcgctc | actgcccgcct | 9120 |
| ttccagtcgg | gaaacctgtc | gtgccagctg | cattaatgaa | tcggccaacg | cgcggggaga | 9180 |
| ggcgggtttgc | gtattgggag | ctcttcgcgt | tctcgcgtca | ctgactcgct | gcgctcggtc | 9240 |
| gttcggctgc | ggcgagcgg | atcagctcac | tcaaaaggcg | taatacgggt | atccacagaa | 9300 |
| tcagggggata | acgcaggaaa | gaacatgtga | gcaaaaggcc | agcaaaaggc | caggaaccgt | 9360 |
| aaaaaggccg | cgttgctggc | gtttttccat | aggctccgcc | cccctgacga | gcatacaaaa | 9420 |
| aatcgacgct | caagtcagag | gtggcgaaac | ccgacaggac | tataaagata | ccaggcggtt | 9480 |
| ccccctggaa | gctccctcgt | gcgctctcct | gttccgaccc | tgcgcgttac | cggataacctg | 9540 |
| tcgcgctttc | tcccttcggg | aagcgtggcg | ctttctcata | gctcacgctg | taggtatctc | 9600 |
| agttcggtgt | aggctcgttc | ctccaagctg | ggctgtgtgc | acgaaccccc | cgttcagccc | 9660 |
| gaccgctgcg | ccttatccgg | taactatcgt | cttgagtcga | acccggtaag | acacgactta | 9720 |
| tcgccactgg | cagcagccac | tggtaacagg | attagcagag | cgaggatagt | aggcgggtgct | 9780 |
| acagagttct | tgaagtgggt | gcctaactac | ggctacacta | gaaggacagt | atttgggtatc | 9840 |
| tgcgctctgc | tgaagccagt | taccttcgga | aaaagagttg | gtagctcttg | atccggcaaaa | 9900 |
| caaaccaccg | ctggtagcgg | tggttttttt | gtttgcaagc | agcagattac | gcgcagaaaa | 9960 |
| aaaggatctc | aagaagatcc | tttgatcttt | tctacggggt | ctgacgctca | gtggaacgaa | 10020 |
| aactcacggt | aagggttttt | ggtcatgaga | ttatcaaaaa | ggatcttcac | ctagatcctt | 10080 |
| ttaaattaaa | aatgaagttt | taaatcaatc | taaagtatat | atgagtaaac | ttggtctgac | 10140 |
| agttaccaat | gcttaatcag | tgaggcacct | atctcagcga | tctgtctatt | tcgttcaccc | 10200 |
| atagttgcct | gactccccgt | cgtgtagata | actacgatac | gggagggcct | accatctggc | 10260 |
| cccagtgctg | caatgatacc | gcgagaccca | cgtcacccgg | ctccagattt | atcagcaata | 10320 |
| aaccagccag | ccggaagggc | cgagcgcaga | agtggctcctg | caactttatc | cgcctccatc | 10380 |
| cagtcctatta | attgttgccg | ggaagctaga | gtaagtagtt | cgccagttaa | tagtttgccg | 10440 |
| aacgttggtg | ccattgctac | aggcctcgtg | gtgtcacgct | cgtcgtttgg | tatggcttca | 10500 |
| ttcagctccg | gttcccaacg | atcaaggcga | gttacatgat | cccccatggt | gtgcaaaaaa | 10560 |
| gcgggttagct | ccttcgggtc | tccgategtt | gtcagaagta | agttggccgc | agtgttatca | 10620 |
| ctcatggtta | tggcagcact | gcataattct | cttactgtca | tgccatccgt | aagatgcttt | 10680 |
| tctgtgactg | gtgagtactc | aaccaagtca | ttctgagaat | agtgtatgcg | gcgaccgagt | 10740 |
| tgtcttgcc | cggcgtaaat | acgggataat | accgcgccac | atagcagaac | tttaaaagtg | 10800 |
| ctcatcattg | gaaaacgttc | ttcggggcga | aaactctcaa | ggatcttacc | gctgttgaga | 10860 |
| tccagttcga | tgtaacccac | tctgtcaccc | aactgatctt | cagcatcttt | tactttcacc | 10920 |
| agcgtttctg | ggtgagcaaa | aacaggaagg | caaaatgccg | caaaaaagg | aataagggcg | 10980 |
| acacggaaat | gttgaatact | catactcttc | ctttttcaat | attattgaag | catttatcag | 11040 |
| ggttattgtc | tcattgagcgg | atacatattt | gaatgtattt | agaaaaataa | acaaataggg | 11100 |
| gttccgcgca | catttccccg | aaaagtgcga | c | | | 11131 |

<210> 10
 <211> 10998
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY8.OZ

<400> 10

ES 2 618 508 T3

```

agatcttgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtg ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
aaattgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac 180
tgatatcgcc atttttccaa aagtgatatt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcget 240
tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggtga cttgggcgat tctgtgtgtc 300
gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg 360
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc 420
attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480
tacgttgtat ccatatcgta atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc 540
atgttgacat tgattattga ctagtattta atagtaatca attacggggt cattagttca 600
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggccgcg ctggctgacc 660
gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 780
acatcaagtg tatcataatg caagtccgcc cctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 840
cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta 900
cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg 960

```


| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| atagcggttt | gactcacggg | gatttccaag | tctccacccc | attgacgtca | atgggagttt | 1020 |
| gttttggcac | caaaatcaac | gggactttcc | aaaatgtcgt | aacaactgcg | atcgcccgcc | 1080 |
| ccgttgacgc | aaatgggcgg | taggcgtgta | cggtgggagg | tctatataag | cagagctcgt | 1140 |
| ttagtgaacc | gggcactcag | attctgcggt | ctgagtcctt | tctctgctgg | gctgaaaagg | 1200 |
| cctttgtaat | aaatataatt | ctctactcag | tccctgtctc | tagtttgtct | gttcgagatc | 1260 |
| ctacagttgg | cgcccgaaca | gggacctgag | agggggcgag | accctacctg | ttgaaacctg | 1320 |
| ctgatecgtag | gatccccggg | acagcagagg | agaacttaca | gaagtcttct | ggaggtgttc | 1380 |
| ctggccagaa | cacaggagga | caggttaagat | tgggagaccc | tttgacattg | gagcaaggcg | 1440 |
| ctcaagaagt | tagagaaggt | gacggatcaa | gggtctcaga | aattaactac | tggttaactgt | 1500 |
| aattgggcgc | taagtctagt | agacttattt | catgatacca | actttgtaaa | agaaaaggac | 1560 |
| tggcagctga | gggatgtcat | tccattgctg | gaagatgtaa | ctcagacgct | ctcaggacaa | 1620 |
| gaaagagagg | cctttgaaag | aacatggtgg | gcaatttctg | ctgtaaagat | gggcctccag | 1680 |
| attaataatg | tagtagatgg | aaaggcatca | ttccagctcc | taagagcgaa | atatgaaaag | 1740 |
| aagactgcta | ataaaaagca | gtctgagccc | tctgaagaat | atctctagaa | ctagtggatc | 1800 |
| ccccgggctg | caggagtggt | gaggcacgat | ggcgcctttg | gtcagggcgg | atccggccat | 1860 |
| tagccatatt | attcattggt | tatatagcat | aatcaatat | tggctattgg | ccattgcata | 1920 |
| cgttgatatc | atatcataat | atgtacattt | atattggctc | atgtccaaca | ttaccggcat | 1980 |
| gttgacattg | attattgact | agttattaat | agtaatcaat | tacggggtca | ttagtccata | 2040 |
| gccccatata | ggagttccgc | gttacataac | ttacggtaaa | tggcccgcc | ggctgaccgc | 2100 |
| ccaacgaccc | ccgcccattg | acgtcaataa | tgacgtatgt | tcccatagta | acgccaatag | 2160 |
| ggactttcca | ttgacgtcaa | tgggtggagt | atttacggta | aactgcccac | ttggcagtac | 2220 |
| atcaagtgtg | tcatatgcca | agtacgcccc | ctattgacgt | caatgacggt | aatggcccg | 2280 |
| cctggcatta | tggccagtag | atgaccttat | gggactttcc | tacttggcag | tacatctacg | 2340 |
| tattagtcac | cgtattacc | atgggtgatc | gggtttggca | gtacatcaat | gggcgtggat | 2400 |
| agcggtttga | ctcacgggga | tttccaaagt | tccaccccat | tgacgtcaat | gggagtttgt | 2460 |
| tttggcacca | aaatcaacgg | gactttccaa | aatgtcgtaa | caactccgcc | caattgacgc | 2520 |
| aaatgggcgg | taggcattgt | cggtgggagg | tctatataag | cagagctcgt | ttagtgaacc | 2580 |
| gtcagatcgc | ctggagacgc | catccacgct | gttttgacct | ccatagaaga | caccgggacc | 2640 |
| gatccagcct | ccgcggcccc | aagcttcagc | tgcctcagga | tctgcggatc | cggggaattc | 2700 |
| cccagttctc | ggatccacca | tgggggatcc | cgtcgtttta | caacgtcgtg | actgggaaaa | 2760 |
| ccctggcggt | acccaactta | atcgcccttc | agcacatccc | cctttcgcca | gctggcgtaa | 2820 |
| tagcgaagag | gcccgcaccg | atcgcccttc | ccaacagttg | cgcagcctga | atggcgaaat | 2880 |
| gcgctttgcc | tgggtttccg | caccagaagc | gggtgcggaa | agctggcgtg | agtgcgatct | 2940 |
| tcctgaggcc | gatactgtcg | tgcgtccctc | aaactggcag | atgcacgggt | acgatgcgcc | 3000 |
| catctacacc | aacgtaacct | atcccattac | ggteaatecg | ccgtttggtc | ccacggagaa | 3060 |
| tccgacgggt | tgttactcgc | tcacatttaa | tgttgatgaa | agctggctac | aggaaggcca | 3120 |
| gacgcgaatt | atttttgatg | gogttaactc | ggcgtttcat | ctgtggtgca | acgggcgctg | 3180 |
| ggtcgggtac | ggccaggaca | gtcgtttgce | gtctgaattt | gacctgagcg | catttttacg | 3240 |
| cgcggagaa | aaccgcctcg | cgggtgatgt | gctgcgttgg | agtacgcggc | gttatctgga | 3300 |
| agatcaggat | atgtggcgga | tgagcggeat | tttccgtgac | gtctcgttgc | tgcataaacc | 3360 |
| gactacacaa | atcagcgatt | tccatgttgc | cactcgtttt | aatgatgatt | tcagccgcgc | 3420 |
| tgtactggag | gctgaagtcc | agatgtgcgg | cgagttgcgt | gactacctac | gggtaacagt | 3480 |
| ttcttttatgg | cagggtgaaa | cgcaggtcgc | cagcggcacc | gcgcctttcg | gcggtgaaat | 3540 |
| tatcgatgag | cgtgggtggt | atgccgatcg | cgtcacacta | cgtctgaacg | tcgaaaaccc | 3600 |
| gaaactgtgg | agcgcgcgaa | tcccgaatct | ctactcgtcg | gtggttgaa | tgcacaccgc | 3660 |
| cgcgggcacg | ctgattgaag | cagaagcctg | cgatgtcggt | ttccgcgag | tccggattga | 3720 |
| aaatgggtctg | ctgctgtcga | acggcaagcc | gttgcgtgatt | cgaggcggtt | accgtcacga | 3780 |
| gcatcatcct | ctgcatggtc | aggtcatgga | tgagcagacg | atggtgcagg | atatcctgct | 3840 |
| gatgaagcag | aacaacttta | acgcgctgcg | ctgttcgcat | tatccgaacc | atccgctgtg | 3900 |
| gtacacgctg | tgcgacgcgt | acggcctgta | tgtggtggat | gaagccaata | ttgaaaccca | 3960 |
| cggcatggtg | ccaatgaatc | gtctgaccca | tgatccgcgc | tggctacccg | cgatgagcga | 4020 |
| acgcgtaacg | cgaatggtgc | agcgcgatcg | taatcaccgc | agtgtgatca | tctggctcgt | 4080 |
| ggggaatgaa | tcaggccacg | gcgctaatac | cgacgcgctg | tatcgtgga | tcaaatctgt | 4140 |
| cgatccttcc | cgcccgggtg | agtatgaagg | cggcggagcc | gacaccacgg | ccaccgatat | 4200 |
| tattttgcccg | atgtacgcgc | gcgtggatga | agaccagccc | ttcccggctg | tgcgaaatg | 4260 |
| gtccatcaaa | aaatggcttt | cgtaccttgg | agagacgcgc | ccgctgatcc | tttgcgaaat | 4320 |
| cgcaccaacg | atgggttaaca | gtcttggcgg | tttcgctaaa | tactggcagg | cgtttcgtca | 4380 |
| gtatccccgt | ttacaggggg | gcttcgtctg | ggactgggtg | gatcagtcgc | tgattaaata | 4440 |
| tgatgaaaac | ggcaaccccg | ggtcggctta | cggcgggtgat | tttggcgata | cgcggaacga | 4500 |
| tcgcagattc | tgtatgaacg | gtctggtctt | tgcgcacgcg | acgcgcacac | cagcgttgac | 4560 |
| ggaaacaaaa | caccagcagc | agtttttcca | gttcgcttta | tcggggcaaa | ccatcgaaat | 4620 |
| gaccagcgaa | tacctgttcc | gtcatagcga | taacgagctc | ctgcactgga | tgggtggcgt | 4680 |
| ggatggtaag | ccgctggcaa | gcggtgaagt | gcctctggat | gtcgtccac | aaggtaaaaa | 4740 |
| gttgattgaa | ctgcctgaac | taccgcagcc | ggagagcgcc | gggcaactct | ggctcacagt | 4800 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| acgcgtagtg | caaccgaacg | cgaccgcatg | gtcagaagcc | gggcacatca | gcgcctggca | 4860 |
| gcagtggggt | ctggcggaag | acctcagtg | gacgctcccc | gccgcgtccc | acgccatccc | 4920 |
| gcacctgacc | accagcgaaa | tggatttttg | catcgagctg | ggtaataagc | gttggcaatt | 4980 |
| taaccgcccag | tcaggcttct | tttcacagat | gtggattggc | gataaaaaac | aactgctgac | 5040 |
| gccgctggcg | gatcagttca | cccgtagacc | gctggataac | gacattggcg | taagtgaagc | 5100 |
| gacccgcatt | gacccaaacg | cctgggtcga | acgctggaag | gcggcgggcc | attaccaggc | 5160 |
| cgaagcagcg | ttgttgcaat | gcacggcaga | tacacttgct | gatgcggtgc | tgattacgac | 5220 |
| cgctcacggc | tggcagcacc | aggggaaaaa | cttattttat | agccggaaaa | cctaccggat | 5280 |
| tgatggtagt | ggtcaaatgg | cgattaccgt | tgatgttgaa | gtggcgagcg | atacaccgca | 5340 |
| tccggcgccg | attggcctga | actgccagct | ggcgagggta | gcagagcggg | taaactggct | 5400 |
| cggattaggg | cgcgaagaaa | actatcccca | ccgccttact | gcgcctgtgt | ttgacggctg | 5460 |
| ggatctgcca | ttgtcagaca | tgtatacccc | gtacgtcttc | ccgagcgaaa | acggtctgcg | 5520 |
| ctgocgggacg | cgcgaattga | attatggccc | acaccagtgg | cgcgcgagct | tccagttcaa | 5580 |
| catcagccgc | tacagtcaac | agcaactgat | ggaaaccagc | catcgccatc | tgctgcacgc | 5640 |
| ggaagaaggc | acatggctga | atatacagcg | ttcccatatg | gggattgggtg | gcgacgactc | 5700 |
| ctggagcccg | tcagtatcgg | cgggaattcca | gctgagcgcc | ggtcgctacc | attaccagtt | 5760 |
| ggtctgggtg | caaaaaataa | aataaccggg | caggggggat | ccgcagatcc | ggctgtggaa | 5820 |
| tgtgtgtcag | ttagggtgtg | gaaagtcgcc | aggctcccca | gcaggcgaaa | gtatgcaaa | 5880 |
| catgcctgca | ggaattcgat | atcaagctta | tcgataccgt | cgacctcgag | ggggggcccg | 5940 |
| gtacccagct | tttgttccct | ttagttaggg | ttaattgcgc | gggaagtatt | tatcactaat | 6000 |
| caagcacaag | taatacatga | gaaactttta | ctacagcaag | cacaatcctc | caaaaaattt | 6060 |
| tgtttttaca | aaatccctgg | tgaacatgat | tggaagggac | ctactagggg | gctgtggaag | 6120 |
| ggtgatgggtg | cagtagtagt | taatgatgaa | ggaaagggaa | taattgctgt | accattaacc | 6180 |
| aggactaagt | tactaataaa | accaaattga | gtattgttgc | aggaagcaag | acccaactac | 6240 |
| cattgttcag | tgtgtttcct | gacctcaata | tttgttataa | ggtttgatat | gaatcccagg | 6300 |
| gggaattctca | acccctatta | cccaacagtc | agaaaaatct | aagtgtgagg | agaacacaa | 6360 |
| gittcaacct | tattgtttata | ataatgacag | taagaacagc | atggcagaat | cgaagggaag | 6420 |
| aagagaccaa | gaatgaacct | gaaagaagaa | tctaaagaag | aaaaaagaag | aaatgactgg | 6480 |
| tggaaaaatag | gtatgtttct | gttatgctta | gcaggaacta | ctggagggaat | actttgggtg | 6540 |
| tatgaaggac | tcccacagca | acattatata | gggttgggtg | cgataggggg | aagattaaac | 6600 |
| ggatctggcc | aataaatgct | tatagaatgc | tgggtttcct | tcccggggtg | tagaccattt | 6660 |
| caaaattact | tcagttatga | gaccaataga | agcatgcata | tggataataa | tactgtcata | 6720 |
| ttattagaag | ctttaaccaa | tataactgct | ctataaataa | caaaacagaa | ttagaaacat | 6780 |
| ggaagttagt | aaagacttct | ggcataactc | ctttacctat | ttcttctgaa | gctaactctg | 6840 |
| gactaattag | acataagaga | gattttggta | taagtgcatt | agtggcagct | attgtagccg | 6900 |
| ctactgctat | tgtctgtagc | gctactatgt | cttatgttgc | tctaactgag | gttaacaaaa | 6960 |
| taatggaagt | acaaaatcat | acttttgagg | tagaaaatag | tactctaaat | ggtatggatt | 7020 |
| taatggaagc | acaaataaag | atatttatgt | ctagatttct | tcaaacacat | gcagatgttc | 7080 |
| aactgttaaa | ggaaagacaa | caggtagagg | agacatttaa | tttaattgga | tgtatagaaa | 7140 |
| gaacacatgt | attttgtcat | actggctcat | cctggaatat | gtcatgggga | cattttaaag | 7200 |
| agtcaacaca | atgggatgac | tgggtaagca | aaatggaaga | tttaaatcaa | gagatactaa | 7260 |
| ctacacttca | tggagccagg | aacaatttgg | cacaatccat | gataacattc | aatacaccag | 7320 |
| atagtatagc | tcaatttggg | aaagaccttt | ggagtcatat | tggaaattgg | attcctggat | 7380 |
| tgggagcttc | cattataaaa | tatatagtga | tgtttttgct | tatttatttg | ttactaacct | 7440 |
| cttcgcctaa | gatcctcagg | gccctctgga | aggtgaccag | tgggtcaggg | ttctccggca | 7500 |
| gtcgtttacct | gaagaaaaaa | ttccatcaca | aacatgcata | gcgagaagac | acctggggac | 7560 |
| aggcccaaca | caacatacac | ctagcaggcg | tgaccgggtg | atcaggggac | aaatactaca | 7620 |
| agcagaagta | ctccaggaac | gactggaatg | gagaatcaga | ggagtacaac | aggcgggcaa | 7680 |
| agagctgggt | gaagtcaatc | gaggcatttg | gagagagcta | tatttccgag | aagaccaaa | 7740 |
| gggagatttc | tcagcctggg | gcggtatcca | acgagcacia | gaacggctct | gggggggaaca | 7800 |
| atcctcacca | agggtccctt | gacctggaga | ttcgaagoga | aggaggaaac | atttatgact | 7860 |
| gttgcattaa | agcccaagaa | ggaactctcg | ctatcccttg | ctgtggattt | cccttatggc | 7920 |
| tattttgggg | actagtaatt | atagtaggac | gcatagcagg | ctatggatta | cgtggactcg | 7980 |
| ctgttataat | aaggatttgt | attagaggct | taaatttgat | atttgaaata | atcagaaaaa | 8040 |
| tgcttgatta | tattggaaga | gcttttaaat | ctggcacatc | tcagtatatc | atgcctcagt | 8100 |
| atgtttagaa | aaacaagggg | ggaactgtgg | ggtttttatg | aggggtttta | taaatgatta | 8160 |
| taagagttaa | aagaaagttg | ctyatgctct | cataaccttg | tataacccaa | aggactagct | 8220 |
| catgttgcta | ggcaactaaa | cgcgaataac | cgcatttgtg | acgcgagttc | cccattgggtg | 8280 |
| acgcgttaac | ttcctgtttt | tacagtatat | aagtgccttg | attctgacaa | ttgggcactc | 8340 |
| agattctgcg | gtctgagctc | cttctctgct | ggcctgaaaa | ggcctttgtg | ataaatataa | 8400 |
| ttctctactc | agtcctctgt | tctagtttgt | ctgttcgaga | tcctacagag | ctcatgcctt | 8460 |
| ggcgtaatca | tggtcatagc | tgttttctgt | gtgaaattgt | tatccgctca | caattccaca | 8520 |
| caacatacga | gcgggaagca | taaagtgtaa | agcctggggg | gcctaattgag | tgagctaact | 8580 |
| cacattaatt | gcgttgcgct | cactgccgcg | tttccagtcg | ggaaacctgt | cgtgccagct | 8640 |

```

gcattaatga atcggccaac ggcgggggag aggcgggtttg cgtattggggc gctcttccgc 8700
ttcctcgctc actgaactgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 8760
ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 8820
agcaaaaggc cagcaaaagg ccagggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 8880
taggtccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 8940
cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 9000
tgttccgacc ctgcccgtta cgggatacct gtcgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 9060
gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 9120
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 9180
tcttgagtc aaccoggtaa gacacgact atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 9240
gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg gccctaacta 9300
cggctacact agaaggacag tatttgggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 9360
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaacaccg gctggtagcg gtggtttttt 9420
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 9480
ttctacgggg tctgacgctc agtggaaaga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 9540
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat 9600
ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaaa tgcttaatac gtgaggcacc 9660
tatctcagcg atctgtctat ttcggttcac catagttgcc tgaactcccc tegtgtagat 9720
aactacgata cgggaggggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 9780
acgctcacgg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgtag 9840
aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagctctatt aattgttgcc gggaagctag 9900
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacggtgtt gccattgcta caggcatcgt 9960
gggtgtcagc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 10020
agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tcttcgggtc ctccgatcgt 10080
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttata actcatggtt atggcagcac tgcataatto 10140
tcttaactgt atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 10200
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 10260
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt ctbcggggcg 10320
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgacacc 10380
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct ggtgagcaa aaacaggaag 10440
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 10500
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 10560
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgc acatttcccc gaaaagtgc 10620
acctaaattg taagcggtta tattttgtta aaattcgct taaatttttg ttaaatacgc 10680
tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaataagac 10740
gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 10800
tocaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 10860
ccctaataca gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaaagc taaatcgga cctaaggg 10920
agccccgat ttagagcttg acggggaaa ccaacctggc ttatcgaaat taatacgact 10980
cactataggg agaccggc

```

<210> 11
 <211> 8870
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY8.1Z

<400> 11

ES 2 618 508 T3

```

agatccttgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtgt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
aaattgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac 180
tgatatcgcc atttttccaa aagtgatatt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct 240
tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggtga cttgggcgat tctgtgtgtc 300
gcaaataatc cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg 360
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc 420
attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480
tacgttgtat ccatatcgta atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc 540
atgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggg cattagttca 600
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 660
gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 780

```

```

acatcaagtg tatcatatgc caagtecgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 840
cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt acgggacctt cctacttggc agtacatcta 900
cgtatttagtc atcgctatta ccattgggtgat gcgggttttgg cagtacacca atggggcgtgg 960
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 1020
gttttggcac caaaatcaac gggacttttc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc 1080
ccgttgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt 1140
ttagtgaacc gggcactcag attctgcggt ctgagtcctt tctctgctgg gctgaaaagg 1200
cctttgtaat aaatataatt ctctactcag tccctgtctc tagtttgtct gttcgagatc 1260
ctacagttgg cgcgcgaaca gggacctgag agggggcgag accctacctg ttgaacctgg 1320
ctgatcgtag gatccccggg acagcagagg agaacttaca gaagtcttct ggaggtgttc 1380
ctggccagaa cacaggagga caggtaagat tgggagacct ttgacattg gagcaaggcg 1440
ctcaagaagt tagagaagg gacggtacaa ggggtctcaga aattaactac tggtaactgt 1500
aattgggcgc taagtctagt agaattattt catgatacca actttgtaaa agaaaaggac 1560
tggcagctga gggatgtcat tccattgctg gaagatgtaa ctgagacgct gtcaggacaa 1620
gaaagagagg cctttgaaag aacatgggtg gcaatttctg ctgtaaagat gggcctccag 1680
attaataatg tagtagatgg aaaggcatca ttccagctcc taagagcgaa atatgaaaag 1740
aagactgcta ataaaaagca gtctgagccc tctgaagaat atctctagaa ctagtggatc 1800
ccccgggctg caggagtggg gaggcacgat ggccgctttg gtcgaggcgg atccggccat 1860
tagccatatt attcattggg tatatagcat tggctattgg ccattgcata 1920
cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca ttaccgccat 1980
gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 2040
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggtgaccgc 2100
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 2160
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 2220
atcaagtgtc tcatatgcca agtacgccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccg 2280
ctgggcatta tgcacagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctaog 2340
tatttagtcat cgtattacc atgggtgatg ggttttggca gtacatcaat ggcgtggat 2400
agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 2460
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 2520
aaatgggcgg taggcatgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 2580
gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc 2640
gatccagcct ccgcggcccc aagcttcage tctgcggatc cctgcggatc cggggaattc 2700
cccagtctca ggatccacca tgggggatcc gctcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2760
ccctggcggt acccaactta atcgccctgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2820
tagcgaagag gccgcacccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2880
gcgctttgce tgggttccgg caccagaagc ggtgcgggaa agctggctgg agtgcgatct 2940
tcttgaggcc gatactgtcg tcgtcccttc aaactggcag atgcacgggt acgatgcgcc 3000
catctacacc aacgtaacct atcccattac ggtcaatccg ccgtttgttc ccaaggagaa 3060
tccgacgggt tgttactcgc tcacatttaa ttttgatgaa agctggctac aggaaggcca 3120
gacgcgaatt atttttgatg gcgttaactc ggcgtttcat ctgtggtgca acgggcgctg 3180
ggtcggttac ggccaggaca gtgcgtttgc gtctgaattt gacctgagcg catttttacg 3240
cgccggagaa aaccgcctcg cgggtgatgt gctgcgttgg agtgacggca gttatctgga 3300
agatcaggat atgtggcgga tgagcggcat tttccgtgac gtctcgttgc tgataaaacc 3360
gactacacaa atcagcgatt tccatgttgc cactcgcttt aatgatgatt tcagccgcgc 3420
tgtactggag gctgaagttc agatgtgcgg cgagttgcgt gactacctac gggtaacagt 3480
ttctttatgg cagggtgaaa cgcaggtcgc cagcggcacc ggcctttcgc gcggtgaaat 3540
tatcgatgag cgtggtggtt atgcgatcg cgtcacacta cgtctgaacg tcgaaaacc 3600
gaaactgtgg agcgcgaaa tccgaatct ctatcgtgcg gtggttgaac tgcacaccgc 3660
cgacggcagc ctgattgaag cagaagcctg cgatgtcggg ttccgcgagg tgcgattga 3720
aaatgggtct ctgctgctga acggcaagcc gttgctgatt cgaggcgta accgtcacga 3780
gcatcatcct ctgcatggtc aggtcatgga tgagcagacg atggtgcagg atatcctgct 3840
gatgaagcag aacaacttta acgcctgctg ctgttcgcat tatecgaacc atccgctgtg 3900
gtacacgctg tgcgacgct acggcctgta tgtggtggat gaagccaata ttgaaacca 3960
cggcatggtg ccaatgaatc gtctgaccga tgatccgcgc tggctaccgg cgtgacgca 4020
acgcgtaacg cgaatggtgc agcgcgatcg taatcaccgc agtgtgatca tctggtcgt 4080
ggggaatgaa tcaggccacg gcgctaatac cgacgcgctg tatcgctgga tcaaatctgt 4140
cgatccttcc cgcgcggtgc agtatgaagg cggcggagcc gacaccacgg ccaccgatat 4200
tatttgcgcc atgtacgcgc gcgtggatga agaccagccc ttcccgctg tgccgaaatg 4260
gtccatcaaa aaatggcttt cgctacctgg agagacgcgc ccgctgatcc tttgcgaata 4320
gccccacggt atgggtaaca gtcttggcgg ttctcgtaaa tactggcagg cgtttcgtca 4380
gtatccccgt ttacagggcg gcttcgctg ggaactgggtg gatcagtcgc cgttttaata 4440
tgatgaaaac ggcaaccgct ggtcggctta cggcgtgat tttggcgata cgcggaacga 4500
tcgccagttc tgtatgaacg gtctgggtct tgccgaccgc acgcgcac 4560
ggaagcaaaa caccagcagc agtttttcca gttccgttta tccgggcaaa ccatcgaagt 4620

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gaccagcgaa | tacctgttcc | gtcatagcga | taacgagctc | ctgcactgga | tggtggcgct | 4680 |
| ggatggtaag | ccgctggcaa | gcggtgaagt | gocctctggat | gtcgctccac | aaggtaaaca | 4740 |
| gttgattgaa | ctgcctgaac | taccgcagcc | ggagagcgcc | gggcaactct | ggctcacagt | 4800 |
| acgcgtagtg | caaccgaacg | cgaccgcattg | gtcagaagcc | gggcacatca | gcgcctggca | 4860 |
| gcagtggcgt | ctggcggaaa | acctcagtg | gacgctcccc | gcccgcgtccc | acgccatccc | 4920 |
| gcatctgacc | accagcgaaa | tggatttttg | catcgagctg | ggtaataaagc | gttggcaatt | 4980 |
| taaccgcccag | tcagggtttc | tttcacagat | gtggatttggc | gataaaaaaac | aactgctgac | 5040 |
| gccgctgccc | gatcagttca | cccgtgcacc | gctggataaac | gacatttggcg | taagtgaagc | 5100 |
| gacccgcatt | gacctaaacg | cctgggtcga | acgctggaag | gcccggggcc | attaccaggc | 5160 |
| cgaagcagcg | ttgttgcagt | gcacggcaga | tacacttgct | gatgcgggtgc | tgattacgac | 5220 |
| cgctcacgcg | tggcagcatc | aggggaaaaac | cttatttatac | agccggaaaa | gcctaccgat | 5280 |
| tgatggtagt | ggtcaaatgg | cgattaccgt | tgatgttgaa | gtggcgagcg | atacacgcga | 5340 |
| tccggcgcg | attggcctga | actgccagct | ggcgagggta | gcagagcggg | taaactggct | 5400 |
| cggattaggg | ccgcaagaaa | actatcccga | ccgccttact | gcccctgtt | ttgaccgctg | 5460 |
| ggatctgcca | ttgtcagaca | tgtatacccc | gtacgtcttc | ccgagcgaaa | acggtctgcg | 5520 |
| ctgcgggacg | cgcaattga | attatggccc | acaccagtg | cgcgcgact | tccagttcaa | 5580 |
| catcagccgc | tacagtcaac | agcaactgat | ggaaaaccagc | catcgccate | tgctgcacgc | 5640 |
| ggaagaaggc | acatggctga | atatcgacgg | ttcccatatg | gggatttggg | gcgcgactc | 5700 |
| ctggagcccg | tcagtatcgg | cggaattcca | gctgagcgcc | ggtcgctacc | attaccagtt | 5760 |
| ggtctggtgt | caaaaataat | aataaccggg | caggggggat | ccgcagatcc | ggctgtggaa | 5820 |
| tgtgtgtcag | ttaggggtgtg | gaaagtcccc | aggctcccca | gcaggcagaa | gtatgcaaag | 5880 |
| catgcctgca | ggaattcgat | atcaagctta | togataccgt | cgaattggaa | gagctttaa | 5940 |
| tccctggcaca | tctcatgtat | caatgcctca | gtatgtttag | aaaaacaagg | ggggaactgt | 6000 |
| ggggttttta | tgaggggttt | tataaatgat | tataagagta | aaaagaaagt | tgctgatgtc | 6060 |
| ctcataacct | tgtataacct | aaaggactag | ctcatgttgc | taggcaacta | aaccgcaata | 6120 |
| accgcatttg | tgacgcgagt | tcccatttgg | tgacgcgtta | acttccctgtt | tttacagtat | 6180 |
| ataagtgtct | gtattctgac | aattgggcac | tcagattctg | cggtctgagt | cccttctctg | 6240 |
| ctgggctgaa | aaggcctttg | taataaatat | aattctctac | tcagtcctctg | tctctagttt | 6300 |
| gtctgttcga | gatcctacag | agctcatgcc | ttggcgtaat | catggtcata | gctgtttcct | 6360 |
| gtgtgaaatt | gttatccgct | cacaattcca | cacaacatac | gagccggaag | cataaagtgt | 6420 |
| aaagcctggg | gtgcctaattg | agtgaagtaa | ctcacattaa | ttgcgttgcg | ctcactgccc | 6480 |
| gctttccagt | cgggaaacct | gtcgtgccag | ctgcattaat | gaatcggcca | acgcgcgggg | 6540 |
| agaggcggtt | tgcgtattgg | gcgctctccc | gcttccctgc | tcactgactc | gctgcgctcg | 6600 |
| gtcgttcggc | tgcggcgagc | ggtatcagct | cactcaaagg | cggtaatatc | gttatccaca | 6660 |
| gaatcagggg | ataacgcagg | aaagaacatg | tgagcaaaa | gccagcaaaa | ggccagggaac | 6720 |
| cgtaaaaagg | ccgcgttgc | ggcgtttttc | cataggctcc | gccccctga | cgagcatcac | 6780 |
| aaaaatcgac | gctcaagtca | gaggtggcga | aaaccgacag | gactataaag | ataccaggcg | 6840 |
| tttccccctg | gaagctccct | cgtgcgctct | cctgttccga | ccctgcgct | taccggatac | 6900 |
| cttctccgct | ttctcccttc | gggaagcgtg | gcgctttctc | atagctcagc | ctcgggtat | 6960 |
| ctcagttcgg | tgtaggtcgt | tcgctccaa | ctgggctgtg | tgcaacgaacc | ccccgttcag | 7020 |
| cccgaccgct | gcgccttatac | cggttaactat | cgtcttgagt | ccaaccgggt | aagacacgac | 7080 |
| ttatcgccac | tggcagcagc | cactggtaac | aggattagca | gagcgaggta | tgtaggcggt | 7140 |
| gctacagagt | tcttgaagtg | gtggcctaac | tacggctaca | ctagaaggac | agtatttgg | 7200 |
| atctgcgctc | tgcgaagcc | agttaccttc | ggaaaaagag | ttggtagctc | ttgatccggc | 7260 |
| aaacaaacca | ccgctggtag | cgttgggttt | tttctttgca | agcagcagat | tacgcgcaga | 7320 |
| aaaaaaggat | ctcaagaaga | tcctttgatac | tttctacgg | ggctctgaoc | tcagtggaac | 7380 |
| gaaaactcac | gttaagggat | tttgggtcatg | agattatcaa | aaaggatctt | cacctagatc | 7440 |
| cttttaaat | aaaaatgaag | ttttaaatca | atctaaagta | tatatgagta | aacttggctc | 7500 |
| gacagttacc | aatgcttaac | cagtgaaggca | cctatctcag | cgatctgtct | atttcgttca | 7560 |
| tccatagttg | cctgactccc | cgtcgtgtag | ataactaocga | tacgggagg | cttaccatct | 7620 |
| ggccccagtg | ctgcaatgat | accgcgagac | ccacgctcac | cggtccaga | tttatcagca | 7680 |
| ataaaccagc | cagccggaag | ggccgagcgc | agaagtggc | ctgcaacttt | atccgcctcc | 7740 |
| atccagtccta | ttaattgttg | ccgggaagct | agagtaagta | gttcgccagt | taatagtttg | 7800 |
| cgcaacggtt | ttgccattgc | tacaggcatc | gtgggtgtcac | gctcgtcgtt | tggtatggct | 7860 |
| tcattcagct | ccggttccca | acgatcaagg | cgagttacat | gatcccccat | gttgtgcaaa | 7920 |
| aaagcggtta | gctccttcgg | tcctccgatac | gttgtcagaa | gtaagttggc | cgcagtgtaa | 7980 |
| tcactcatgg | ttatggcagc | actgcataat | tctcttactg | tcattgcccac | cgtaagatgc | 8040 |
| ttttctgtga | ctgggtgagta | ctcaaccaag | tcattctgag | aatagtgtat | gcccgcagccg | 8100 |
| agttgctctt | gcccggcgctc | aatacgggat | aataccgcgc | cacatagcag | aactttaaaa | 8160 |
| gtgctctatca | ttggaaaaacg | ttcttcgggg | cgaaaactct | caaggatctt | accgctgttg | 8220 |
| agatccagtt | cgatgtaacc | cactcgtgca | cccaactgat | cttcagcatc | ttttactttt | 8280 |
| accagcgttt | ctgggtgagc | aaaaacagga | aggcaaaatg | ccgcaaaaaa | gggaataagg | 8340 |
| gcgacacgga | aatgttgaat | actcatactc | ttcctttttc | aatattattg | aagcatttat | 8400 |
| cagggttatt | gtctcatgag | cggatacata | tttgaatgta | tttagaaaaa | taaacaaata | 8460 |

ES 2 618 508 T3

```

ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt 8520
taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gtcatttttt taaccaatag gccgaaatcg 8580
gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt 8640
ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct 8700
atcagggcga tggcccaacta cgtgaaccat caccctaate aagttttttg gggtcgaggt 8760
gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct tgacggggaa 8820
agccaacctg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagaccggc 8870

```

<210> 12
 <211> 12481
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY3.1

<400> 12

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| agatcttcaa | tattggccat | tagccatatt | attcattggg | tatatagcat | aatcaatat | 60 |
| tggctattgg | ccattgcata | cgttgatct | atatcataat | atgtacattt | atattggctc | 120 |
| atgtccaata | tgaccgccat | gttggcattg | attattgact | agttattaat | agtaataaat | 180 |
| tacgggggtca | ttagttcata | gcccataat | ggagttccgc | gttacataac | ttacggtaaa | 240 |
| tggcccgct | ggtgacccg | ccaacgacc | ccgccattg | acgtcaataa | tgacgtatgt | 300 |
| tcccatagta | acgccaatag | ggactttcca | ttgacgtcaa | tgggtggagt | atttacggta | 360 |
| aactgcccac | ttggcagtag | atcaagtgt | tcatatgcca | agtccgcccc | ctattgacgt | 420 |
| caatgacggg | aaatggcccc | cctggcatta | tggccagtag | atgaccttac | gggactttcc | 480 |
| tacttggcag | tacatctacg | tattagtcac | cgtctattac | atgggtgatgc | ggttttggca | 540 |
| gtacaccaat | gggctgggat | agcggtttga | ctcacgggga | tttccaagtc | tccaccccc | 600 |
| tgacgtcaat | gggagtttgt | tttggcacca | aaatcaacgg | gactttccaa | aatgtcgtaa | 660 |
| caactgcgat | cgcccgcccc | gttgacgcaa | atggggcggt | ggcgtgtacg | gtgggaggtc | 720 |
| tatataagca | gagctcggtt | agtgaaccgt | cagatcacta | gaagctttat | tgggtaggtt | 780 |
| tatcacagtt | aaattgctaa | cgcagtcagt | gcttctgaca | caacagctct | gaacttaagc | 840 |
| tgcagtgact | ctcttaaggt | agccttgtag | aagttggctg | tgaggcactg | ggcaggttaag | 900 |
| tatcaagggt | acaagacagg | tttaaggaga | ccaatagaaa | ctgggcttgt | cgagacagag | 960 |
| aagactcttg | cgtttctgat | aggcacctat | tggctctact | gacatccact | ttgcctttct | 1020 |
| ctccacaggt | gtccactccc | agttcaatta | cagctcttaa | ggctagagta | cttaatacga | 1080 |
| ctcactatag | gctagcctcg | aggctgacgg | tatcgcccc | acagggacct | gagaggggag | 1140 |
| cagaccctac | ctggtgaacc | tggctgatcg | taggatcccc | gggacagcag | aggagaactt | 1200 |
| acagaagtct | tctggagggt | ttcctggcca | gaacacagga | ggacaggtaa | gatgggagac | 1260 |
| cctttgacat | ggagcaaggc | gctcaagaag | ttagagaagg | tgacgggtaca | agggctctcag | 1320 |
| aaattaacta | ctggtaactg | taattgggag | ctaagtctag | tagacttatt | tcatgatacc | 1380 |
| aactttgtaa | aagaaaagga | ctggcagctg | agggatgtca | ttccattgct | ggaagatgta | 1440 |
| actcagacgc | tgtcaggaca | agaaagagag | gcctttgaaa | gaacatgggt | ggcaatttct | 1500 |
| gctgtaaaaga | tgggcctcca | gattaataat | gtagtagatg | gaaaggcatc | attccagctc | 1560 |
| ctaagagcga | aatatgaaaa | gaagactgct | aataaaaaag | agtctgagcc | ctctgaagaa | 1620 |
| tatccaatca | tgatagatgg | ggctggaaac | agaaatttta | gacctctaac | acctagagga | 1680 |
| tatactactt | gggtgaatac | catacagaca | aatgggtctat | taaatgaagc | tagtcaaaac | 1740 |
| ttatttggga | tattatcagt | agactgtact | tctgaagaaa | tgaatgcatt | tttggatgtg | 1800 |
| gtacctggcc | aggcaggaca | aaagcagata | ttacttgatg | caattgataa | gatagcagat | 1860 |
| gattgggata | atagacatcc | attaccgaat | gctccactgg | tggcaccacc | acaagggcct | 1920 |
| attcccatga | cagcaagggt | tattagagggt | ttaggagtag | ctagagaaaag | acagatggag | 1980 |
| cctgcttttg | atcagtttag | gcagacatat | agacaatgga | taatagaagc | catgtcagaa | 2040 |
| ggcatcaaag | tgatgattgg | aaaacctaaa | gctcaaaaata | ttaggcaagg | agctaaggaa | 2100 |
| ccttaccag | aatttgtaga | cagactatta | tcccaaataa | aaagtgaggg | acatccacaa | 2160 |
| gagatttcaa | aattcttgac | tgatacacctg | actattcaga | acgcaaatag | ggaatgtaga | 2220 |
| aatgctatga | gacatttaag | accagaggat | acattagaag | agaaaatgta | tgcttgcaga | 2280 |
| gacattggaa | ctacaaaaca | aaagatgatg | ttattggcaa | aagcacttca | gactgggtctt | 2340 |
| gcgggcccac | ttaaagggtg | agccttgaaa | ggagggccac | taaaggcagc | acaaacatgt | 2400 |
| tataactgtg | ggaagccagg | acatttatct | agtcaatgta | gagcacctaa | agtctgtttt | 2460 |
| aaatgtaaac | agcctggaca | tttctcaaa | caatgcagaa | gtgttccaaa | aaacgggaag | 2520 |
| caaggggctc | aaggggaggc | ccagaaacaa | actttcccga | tacaacagaa | gagtcagcac | 2580 |
| aacaaatctg | ttgtacaaga | gactcctcag | actcaaaaatc | tgtaccacga | tctgagcgaa | 2640 |
| ataaaaaagg | aatacaatgt | caaggagaag | gatcaagtag | aggatctcaa | cctggacagt | 2700 |
| ttgtgggaggt | aacatataat | ctagagaaaa | ggcctactac | aatagtatta | attaatgata | 2760 |


```

ctcccttaaa tgtactgtta gacacaggag cagatacttc agtggtgact actgcacatt 2820
ataatagggtt aaaatataga gggagaaaat atcaaggagc ggggaataata ggagtgggag 2880
gaaatgtgga aacattttct acgcctgtga ctataaagaa aaagggtaga cacattaaga 2940
caagaatgct agtggcagat attccagtga ctattttggg acgagatatt cttcaggact 3000
taggtgcaaa attggttttg gcacagctct ccaaggaaat aaaattttag aaaatagagt 3060
taaaagaggg cacaatgggg ccaaaaattc ctcaatggcc actcactaag gagaaactag 3120
aaggggccaa agagatagtc caaagactat tgtcagaggg aaaaatatca gaagctagt 3180
acaataatcc ttataattca cccatatttg taataaaaa gaggtctggc aaatggaggt 3240
tattacaaga tctgagagaa ttaaacaaaa cagtacaagt aggaacggaa atatccagag 3300
gattgcctca cccgggagga ttaattaaat gtaaacacat gactgtatta gatattggag 3360
atgcataatt cactataccc ttagatccag agtttagacc atatacagct ttcactatc 3420
cctccattaa tcatcaagaa ccagataaaa gatattgttg gaaatgttta ccacaaagat 3480
tcgtgttgag cccatatata tatcagaaaa cattacagga aattttacaa ccttttaggg 3540
aaagatatcc tgaagtacaa ttgtatcaat atatggatga tttgttcatt ggaagtaatt 3600
gtttcaaaaa acaacacaaa gagttaatca tagaattaag ggcgatctta ctggaaaagg 3660
gttttgagac accagatgat aaattacaag aagtgccacc ttatagctgg ctaggttatt 3720
aactttgtcc tgaattttgg aaagtacaaa aaatgcaatt agacatggta aagaatccaa 3780
cccttaatga tgtgcaaaaa ttaatgggga atataacatg gatgagctca gggatcccag 3840
ggttgacagt aaaacacatt gcagctacta ctaagggatg tttagagttg attcaaaaa 3900
taattttgac ggaagaggca caaaaagagt tagaagaaaa taatgagaag attaaaaatg 3960
ctcaagggtt acaatattat aatccagaag aagaaatgtt atgtgaggtt gaaattacaa 4020
aaaattatga ggcaacttat gttataaaac aatcacaaag aatcctatgg gcaggtaaaa 4080
agattatgaa ggctaataag ggatgggtcaa cagtaaaaaa tttaatgtta ttgttgcaac 4140
atgtggcaac agaaagtatt actagagtag gaaaatgtcc aacgtttaag gtaccattta 4200
ccaaagagca agtaatgtgg gaaatgcaaa aaggatggta ttattcttgg ctcccagaaa 4260
tagtatatac acatcaagta gttcatgatg attggagaat gaaatttgga gaagaacct 4320
catcaggaat aacaatatac actgatgggg gaaaacaaaa tggagaagga atagcagctt 4380
atgtgaccag taatgggaga actaaacaga aaaggttagg acctgtcact catcaagttg 4440
ctgaaagaat ggcaatacaa atggcattag aggataccag agataaacia gtaaatatag 4500
taactgatag ttattattgt tggaaaaata ttacagaagg attaggttta gaaggaccac 4560
aaagtccctg gtggcctata atacaaaaata tacagaaaaa agagatagtt tattttgctt 4620
gggtacctgg tcacaaaggg atatatggta atcaattggc agatgaagcc gcaaaaaata 4680
aagaagaaat catgctagca taccaaggca cacaatttaa agagaaaaa gatgaagatg 4740
cagggtttga cttatgtgtt ccttatgaca tcatgatacc tgtatctgac acaaaaatca 4800
taccacaga tgtaaaaatt caagttcttc ctaatagctt tggatgggtc actgggaaat 4860
catcaatggc aaaacagggg ttattaatta atggaggaat aattgatgaa ggatatacag 4920
gagaaataca agtgatatgt actaatattg gaaaaagtaa tattaataa atagagggac 4980
aaaaatttgc acaattaatt atactacagc atcactcaaa ttccagacag ccttgggatg 5040
aaaaataaaa atctcagaga ggggataaag gatttggaa tacaggagta ttctgggatg 5100
aaaatattca ggaagcaca gatgaacatg agaattggca tacatcacca aatgatttgg 5160
caagaaatta taagatacca ttgactgtag caaacagat aactcaagaa tgtcctcatt 5220
gcactaagca aggatcagga cctgcagggt gtgtcatgag atctcctaatt cattggcagg 5280
cagattgcac acatltggac aataagataa tattgacttt tgtagagtea aattcaggat 5340
acatacatgc tacattattg tcaaaagaaa atgcattatg tacttcattg gctattttag 5400
aatgggcaag attgttttca ccaaagtcc tacacacaga taacggcact aattttgtgg 5460
cagaaccagt tgtaaatttg ttgaagttcc taagatagc acataccaca ggaataccat 5520
atcatccaga aagtcagggt attgtagaaa gggcaaatag gaccttgaag gagaaagatt 5580
aaagtcatag agacaacact caaacactgg aggcagcttt acaacttgct ctcattactt 5640
gtaacaaaag gagggaaagt atgggaggac agacaccatg ggaagtattt atcactaaic 5700
aagcacaagt aatacatgag aaacttttac tacagcaagc acaatcctcc aaaaaatttt 5760
gtttttacaa aatccctggg gaacatgatt ggaagggacc tactagggtg ctgtggaagg 5820
gtgatgggtc agtagtagtt aatgatgaag gaaagggaat aattgctgta ccattaacca 5880
ggactaagtt actaataaaa ccaaattgag tattgttgca ggaagcaaga cccaactacc 5940
attgtcagct gtgtttctcg aggtctctag gaattgatta cctcgatgct tcattaagga 6000
agaagaataa acaaaagact agggcaatcc aacaaggaa acaacctcaa ttttgttat 6060
aaggtttgat atatgggagt atttggtaaa ggggtaacat ggtcagcatc gcattctatg 6120
ggggaatccc agggggaatc tcaaccccta ttaccaaca gtcagaaaaa tctaagtgtg 6180
aggagaacac aatgtttcaa ccttattgtt ataataatga cagtaagaac agcatggcag 6240
aatcgaagga agcaagagac caagaaatga acctgaaaga agaattctaa gaagaaaaaa 6300
gaagaaatga ctggtggaaa ataggtatgt ttctgttatg cttagcagga actactggag 6360
gaatactttg gtggtatgaa ggactcccac agcacatta tatagggttg gtggcagatg 6420
ggggaagatt aaacggatct ggccaatcaa atgctataga atgctgggtg tcctcccg 6480
ggtgtagacc atttcaaaat tacttcagtt atgagaccaa tagaagcatg catatggata 6540
ataatactgc tacattatta gaagctttta ccaatataac tgctctataa ataacaaaac 6600

```

```

agaattagaa acatggaagt tagtaaagac ttctggcata actcctttac ctattttcttc 6660
tgaagctaac actggactaa ttagacataa gagagatttt ggtataagtg caatagtggc 6720
agctattgta gccgctactg ctattgctgc tagcgctact atgtcttatg ttgctctaac 6780
tgagggttaac aaaataatgg aagtacaaaa tcatactttt gaggtagaaa atagtactct 6840
aaatggtatg gatttaatag aacgacaaat aaagatatta tatgctatga ttcttcaaac 6900
acatgcagat gttcaactgt taaaggaaag acaacaggta gaggagacat ttaatttaat 6960
tggatgtata gaaagaacac atgtattttg tcatactggg catccctgga atagtctatg 7020
gggacattta aatgagtcaa cacaatggga tgactgggta agcaaaatgg aagattttaa 7080
tcaagagata ctaactacac ttcatggagc caggaacaat ttggcacaat ccatgataac 7140
attcaatata ccagatagta tagctcaatt tggaaaagac ctltggagtc atattggaaa 7200
ttggattcct ggattgggag ctccattat aaaatatata gtgatgtttt tgcttattta 7260
tttgttacta acctcttcgc ctaagatcct cagggccctc tggaaagggtga ccagtgggtg 7320
agggctctcc ggcagtcgtt acctgaagaa aaaaattccat cacaacatg ccctgcgaga 7380
agacacctgg gaccaggccc aacacaacat acacctagca ggcgtgaccg gtggatcagg 7440
ggacaaatac tacaagcaga agtactccag gaacgactgg aatggagaat cagaggagta 7500
caacaggcgg ccaaagagct ggggtgaagtc aatcgaggca tttggagaga gctatatttc 7560
cgagaagacc aaaggggaga tttctcagcc tggggcggct atcaacgagc acaagaacgg 7620
ctctgggggg aacaatcctc accaagggtc cttagacctg gagattcgaa gcgaaggagg 7680
aaacatttat gactgttgca ttaaagccca agaaggaact ctgctatcc cttgctgtgg 7740
atttccctta tggctatttt ggggactagt aattatagta ggacgcatag caggctatgg 7800
attacgtgga ctgctgtta taataaggat ttgtattaga ggcttaaatt tgatatttga 7860
aataatcaga aaaatgcttg attatattgg aagagcttta aatcctggca catctcatgt 7920
atcaatgcct cagtatgttt agaaaaacaa ggggggaact gtggggtttt tatgaggggt 7980
tttataaatg attataagag taaaaagaaa gttgctgatg ctctcataac cttgtataac 8040
ccaaaggact agtcatgtt gctaggcaac taaaccgcaa taaccgcatt tgtgacgca 8100
gttccccatt ggtgacgcgt ggtacctcta gagtcgacc ccggcgccgc ttccctttag 8160
tgaggggttaa tgcctcgagc agacatgata agatacattg atgagtttg acaaaaccaca 8220
actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tctttatttt 8280
gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt 8340
caggttcagg gggagatgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtgg 8400
aaaatccgat aaggatcgat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccg ccgatcgcc 8460
cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg cctgtagcg gcgcatlaag 8520
cgcgccgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgetaca ettgacagc ccctagcgc 8580
cgctctcttc gctttcttc ctccctttct gcgcacgttc ccggccttc tccgtaagc 8640
tctaaatcgg gggtccctt tagggttcgc atttagagct ttacggcacc tccgataga 8700
aaaacttgat ttgggtgatg gttcacgtag tgggccatcg cctgataga cggtttttcg 8760
ccctttgacg ttggagtcca cgttctttta tagtggaact ttgttccaa ctggaacaac 8820
actcaaccct atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcgccca 8880
ttggttaaaa aatgagctga tttacaaat atttaacgcg aattttaaca aaatattaac 8940
gtttacaatt tgcctgatg cggtattttc tctttacgca tctgtgcgg atttcacac 9000
gcatacgcgg atctgcgcag caccatggcc tctgaaagag tctgaaagag gaacttgg 9060
aggtaccttc tgaggcgga agaaccagct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 9120
gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac 9180
caggtgtgga aagtccdcag gctccdcagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattcaa 9240
ttagtcagca accatagtc tcccccctaa tccgccatc ccgccctaa ctccgccag 9300
ttccgcccat tctccgcccc atggetgact aatttttttt atttatgcag aggcgcaggc 9360
cgctcgggac cttagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gctaggctt 9420
ttgcaaaaag cttagctat ctgacacaa agtctcgaa ttaaggctag agccaccatc 9480
attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc 9540
tatgactggg cacaacagac aatcggtgc tctgatgcc ccgtgttccg gctgtcagcg 9600
caggggcggc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag 9660
gacgaggcag cgcggctatc gtggtggcc acgacgggag ttccttgccg agctgtgctc 9720
gacgttgtca ctgaagcggg aagggaactg ctgctattgg gcgaagtgc ggggcaggat 9780
ctcctgtcat ctacacttgc tectgcccag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg 9840
cggctgcata cgttgatcc ggtacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgatc 9900
gagcgagcac tgaactggat cgaactgttc cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag 9960
catcaggggc tgcgcacagc gccaggctca aggcgcgcac gcccgacggc 10020
gaggatctcg tctgaccca tggcgatgcc tgcctgccga atatcatggt ggaaaatggc 10080
cgctttctcg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata 10140
gcgttggtca ccgtgatat tgcgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc 10200
gtgctttacg gtatgcgcgc tcccgattcg cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac 10260
gagttcttct gagcgggact ctgggggttcg aaatgaccga ccaagcgag ccttcttgac 10320
catcacgatg gcgcgaataa aatatcttta ttttcattac atctgtgtgt tggttttttg 10380
tgtgaatcga tagcgataag gatccgcgta tgggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat 10440

```

```

gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct 10500
tgtctgetcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgacgc tctccgggag ctgcatgtgt 10560
cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgccta 10620
tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg cacttttcgg 10680
ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta ttttcttaaa tacattcaaa tatgtatccg 10740
ctcatgagac aataacccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 10800
attcaacatt tccgtgtcgc ctttattccc ttttttgccg cattttgcct tectgttttt 10860
gctcaccagc aaacgctggg gaaagtataa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt 10920
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgagaa 10980
cgttttccaa tgatgagcac ttttaaggtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt 11040
gacgcggggc aagagcaact cggtcgcccgc atacactatt ctgagaatga cttgggttgag 11100
tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 11160
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcgaggga 11220
ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt 11280
tggaacccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 11340
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaaac tacttactct agcttccggg 11400
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagtgtcag gaccacttct gcgctcggcc 11460
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcgg 11520
atcattgcag cactggggcc agatggtaag cctcccgta tctagttat ctacacgacg 11580
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 11640
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 11700
cttcattttt aattttaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa 11760
atcccttaac gtgagttttt gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 11820
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 11880
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 11940
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccctctag tgtagccgta gttaggccac 12000
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgetaatcct gttaccagt 12060
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 12120
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 12180
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cagcctccc 12240
gaaggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 12300
agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tgcacacctc 12360
tgacttgagc gtcgattttt gtagtgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 12420
agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catggctcga 12480
c 12481

```

<210> 13
 <211> 6395
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pCIneoERev

<400> 13

ES 2 618 508 T3

```

tgaataataa aatgtgtggt tgtecgaaat acgcggtttg agatttctgt cgcgcactaa 60
attcatgtcg cgcgatagtg gtgtttatcg ccgatagaga tggcgatatt ggaaaaattg 120
atatttgaaa atatggcata ttgaaaatgt cgcgatgtg agtttctgtg taactgatat 180
cgccattttt ccaaaagtga tttttgggca tacgcgatat ctggcgatag cgcttatatc 240
gtttacgggg gatggcgata gacgactttg gtgacttggg cgattctgtg tgtecgaaat 300
atcgagttt cgatataggt gacagacgat atgaggctat atcgcgata gagggcgacat 360
caagctggca catggccaat gcatatcgat ctatacattg aatcaatatt ggccattagc 420
catattatc atttggtata tagcataaat caatattggc tattggccat tgcatacgtt 480
gtatccatat cgtaatatgt acatttatat tggctcatgt ccaacattac cgccatggtg 540
acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 600
atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgccccaa 660
cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 720
tttcatttga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca 780
agtgtatcat atgccaagtc cgcacctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgctg 840
gcattatgoc cagtacatga ccttacggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt 900
agtcacgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac accaatgggc gtggatagcg 960
gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcfaatggga gtttggtttg 1020
gcacccaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaa tcgcatcgcc cgccccgtt 1080

```

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| acgcaaatgg | gcggtaggcg | tgtacgggtg | gagggtctata | taagcagagc | tcggttagtg | 1140 |
| aaccgtcaga | tcactagaag | ctttattgcg | gtagttttatc | acagtttaaat | tgctaacgca | 1200 |
| gtcagtgctt | ctgacacaac | agtctcgaac | ttaagctgca | gtgactctct | taaggtagcc | 1260 |
| ttgcagaagt | tggtcgtgag | gcactgggca | ggtaagtatc | aaggttacaa | gacaggttta | 1320 |
| aggagaccaa | tagaaactgg | gcttgctcgag | acagagaaga | ctcttgcggt | tctgataggc | 1380 |
| acctattggt | cttactgaca | tccacttttg | ctttctctct | acagggtgtcc | actcccagtt | 1440 |
| caattacagc | tcttaaggct | agagtactta | atacgactca | ctataggcta | gtaacggccg | 1500 |
| ccagtggtgt | ggaattcggc | ttatggcaga | atcgaaggaa | gcaagagacc | aagaaatgaa | 1560 |
| cctgaaagaa | gaatctaaag | aagaaaaaag | aagaaatgac | tggtggaaaa | tagatcctca | 1620 |
| gggccctctg | gaaggtgacc | agtgggtgcag | ggctctcogg | cagtcggttac | ctgaagaaaa | 1680 |
| aattccatca | caaacatgca | tcgcgagaag | acacctggga | ccaggcccaa | cacaacatac | 1740 |
| acctagcagg | cgtgaccggg | ggatcagggg | acaaatacta | caagcagaag | tactccagga | 1800 |
| acgactggaa | tggagaatca | gaggagtaca | acaggcggcc | aaagagctgg | gtgaagtcaa | 1860 |
| tcgaggcatt | tggagagagc | tatatttccg | agaagaccaa | aggggagatt | tctcagcctg | 1920 |
| ggggcggtat | caacgagcac | aagaacggct | ctggggggaa | caatcctcac | caagggtctc | 1980 |
| tagacctgga | gattcgaagc | gaaggaggaa | acattttatga | agccgaattc | tcgagatate | 2040 |
| catcacactg | gcggcggctt | cccttttagtg | agggttaatg | cttcgagcag | acatgataag | 2100 |
| atacattgat | gagtttgagc | aaaccacaac | tagaatgcag | tgaaaaaaat | gctttatttg | 2160 |
| tgaattttgt | gatgctattg | ctttattttgt | aaccattata | agctgcaata | aacaagttaa | 2220 |
| caacaacaat | tgcatlcatt | ttatgtttca | gggttcagggg | gagatgtggg | aggtttttta | 2280 |
| aagcaagtaa | aacctctaca | aatgtggtaa | aatccgataa | ggatcgatcc | gggctggcgt | 2340 |
| aatagcgaag | aggcccgcac | cgatcgccct | tcccaacagt | tgccgcagcct | gaatggcgaa | 2400 |
| tgagcgcgcc | ctgtagcggc | gcattaaagc | cggcggggtg | ggtggttacg | cgcagcgtga | 2460 |
| ccgctacact | tgccagcgcc | ctagcgcccg | ctcctttcgc | ttctctccct | tcctttctcg | 2520 |
| ccacgttcgc | cggtcttccc | cgtaaacgct | taaatcgggg | gctcccttta | gggttccgat | 2580 |
| ttagagcttt | acggcacctc | gaccgcacaa | aacttgattt | gggtgatggg | tcacgtagtg | 2640 |
| ggccatcgcc | ctgatagacg | gtttttcgcc | ctttgacggt | ggagtccacg | ttctttaata | 2700 |
| gtggactctt | gttccaaact | ggaacaacac | tcaaccctat | ctcgggtctat | tcttttgatt | 2760 |
| tataagggat | tttgccgatt | tcggcctatt | ggttaaaaaa | tgagctgatt | taacaaatat | 2820 |
| ttaacgcgaa | tttaacaaa | atattaacgt | ttacaatttc | gcctgatgcg | gtattttctc | 2880 |
| cttacgcate | tgtgcggtat | ttcacacgcg | atacgcggat | ctgcgcagca | ctatggcctg | 2940 |
| aaataacctc | tgaagagga | acttggttag | gtacctctct | aggcggaag | aaccagctgt | 3000 |
| ggaatgtgtg | tcagttaggg | tgtggaaagt | ccccaggctc | cccagcaggc | agaagtatgc | 3060 |
| aaagcatgca | tctcaattag | tcagcaacca | ggtgtggaaa | gtccccaggc | tccccagcag | 3120 |
| gcagaagtat | gcaaagcatg | catctcaatt | agtcagcaac | catagtcccg | cccctaactc | 3180 |
| cgcccatccc | gcccctaact | ccgcccagtt | ccgcccattc | tccgcccctat | ggctgactaa | 3240 |
| ttttttttat | ttatgcagag | gccgaggccg | cctcgggcct | tgagctattc | cagaagtagt | 3300 |
| gaggaggctt | ttttggaggc | ctaggccttt | cgaaaaagct | tgattctctc | gacacaacag | 3360 |
| tctcgaactc | aaggctagag | ccaccatgat | tgaacaagat | ggattgcacg | cagggtctct | 3420 |
| ggccgcttgg | gtggagaggc | tattcggtca | tgactgggca | caacagacaa | tcggctgtct | 3480 |
| tgatgccgcc | gtgttcgggc | tgtcagcgca | ggggcgcccg | gttctttttg | tcaagaccga | 3540 |
| cctgtccggg | gccctgaatg | aactgcagga | cgaggcagcg | cggctatcgt | ggctggccac | 3600 |
| gacgggctgt | ccttgccgag | ctgtgctcga | cgttgtcact | gaagcgggaa | gggactggct | 3660 |
| gctatttcag | gaagtgcggc | ggcaggatct | cctgtcactc | cactttgtct | ctgcgagaaa | 3720 |
| agttaccatc | atggctgatg | caatgcggcg | gctgcatacg | cttgatccgg | ctacctgcc | 3780 |
| attcgaccac | caagcgaaac | atcgcatcga | gcgagcacgt | actcggatgg | aagccggctc | 3840 |
| tgtcgatcag | gatgatctgg | acgaagagca | tcaggggctc | gcgccagccg | aactgttcgc | 3900 |
| caggctcaag | gcgcgcacgc | ccgacggcga | ggatctcgtc | gtgacccatg | gcgatgcctg | 3960 |
| cttgccgaat | atcatggtgg | aaaatggccg | ctttcttgga | ttcatcgact | gtggccggct | 4020 |
| gggtgtggcg | gaccgctatc | aggacatagc | gttggctacc | cgtgatattg | ctgaagagct | 4080 |
| tggcggcgaa | tgggctgacc | gcttcctcgt | gctttacggg | atcgccgctc | ccgattcgca | 4140 |
| gcgcacgcgc | ttctatcgcc | ttcttgacga | gttctctctg | gcgggactct | ggggttcgaa | 4200 |
| atgaccgacc | aagcgacgcc | caacctgcca | tcacgatggc | cgcaataaaa | tatctttatt | 4260 |
| ttcattacat | ctgtgtgttg | gttttttgtg | tgaatcgata | gcgataagga | tccgcgtatg | 4320 |
| gtgcactctc | agtacaatct | gctctgatgc | cgcatagtta | agccagcccc | gacacccgcc | 4380 |
| aacacccgct | gacgcgcctt | gacgggcttg | tctgctcccg | gcacccgctt | acagacaagc | 4440 |
| tgtgaccgtc | tcggggagct | gcattgttca | gaggttttca | ccgtcatcac | cgaaacgcgc | 4500 |
| gagacgaaag | ggcctcgtga | tacgcctatt | tttatagggt | aatgtcatga | taataatggt | 4560 |
| ttcttagacg | tcaggtagga | cttttcgggg | aaatgtgcgc | ggaaccccta | tttgtttatt | 4620 |
| tttttaataa | cattcaataa | tgtatccgct | catgagacaa | taacctgat | aaatgcttca | 4680 |
| ataatattga | aaaaggaaga | gtatgagtat | tcaacatttc | cgtgtcgccc | ttattccctt | 4740 |
| ttttgcgcca | ttttgccttc | ctgtttttgc | tcacccagaa | acgctgggtga | aagtaaaaga | 4800 |
| tgctgaagat | cagttgggtg | cacgagtggg | ttacatcgaa | ctggatctca | acagcggtaa | 4860 |
| gaccccttag | agttttcgcc | ccgaagaacg | ttttccaatg | atgagcaact | ttaaagtctc | 4920 |

ES 2 618 508 T3

```

gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccggggcaa gagcaactcg gtcgccgcgat 4980
acactattct cagaatgact tgggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 5040
tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acaactgcggc 5100
caacttactt ctgacaaaga tccgaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat 5160
gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 5220
cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 5280
tggcgaaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg aggcggataa 5340
agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggttttattg ctgataaaatc 5400
tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc 5460
ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 5520
acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta 5580
ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 5640
gatccctttt gataatctca tgacaaaat ccottaacgt gagttttcgt tccactgagc 5700
gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat 5760
ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcggtg gtttggtttg cggtatcaaga 5820
gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaataactgt 5880
ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 5940
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 6000
cgggttgagc tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg 6060
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 6120
tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag 6180
cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaaacg cctggtatct 6240
ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 6300
agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttaacggt tcttggcctt 6360
ttgctggcct tttgctcaca tggtcgcaca gatct 6395

```

<210> 14
 <211> 5961
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pESYNREV

<400> 14

```

tcaatattgg ccattagecca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccattgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaattg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggaactt ccaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccgttgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgggtggg ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgoggt agtttatcac 780
agttaaattg ctaacgcagt cagtgtttct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840
gactctctta aggtagcctt gcagaagttg tctgtgaggc actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcgtttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgect ttctctccac 1020
aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcaact 1080
ataggctagc ctcgagaatt cgcaccatg gctgagagca aggaggccag ggatcaagag 1140
atgaacctca aggaagagag caaagaggag aagcgccgca acgactggtg gaagatcgac 1200
ccacaaggcc cctggagggg ggaccagtgg tgcgcgtgc tgagacagtc cctgcccag 1260
gagaagattc ctagccagac ctgcatcgcc agaagacacc tcggccccgg tcccaccag 1320
cacacacctt ccagaaggga taggtggatt aggggccaga ttttgcaagc cgaggtcctc 1380
caagaaaggc tggaatggag aattaggggc gtgcaacaag ccgctaaaga gctgggagag 1440
gtgaatcgcg gcactctggg ggagctctac ttccgcgagg accagagggg cgatttctcc 1500
gcatggggag gctaccagag ggcacaagaa aggcgtgtgg gcgagcagag cagccccgc 1560
gtcttgaggc ccggagactc caaaagacgc cgcaaacacc tgtgaagtcg acccgggcgg 1620
ccgttccct ttagtgaggg ttaatgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt 1680

```

ES 2 618 508 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ttggacaaac | cacaactaga | atgcagtgaa | aaaaatgctt | tatttgtgaa | atttgtgatg | 1740 |
| ctatttgcttt | atttgttaacc | attataagct | gcaataaaca | agttaacaac | aacaattgca | 1800 |
| ttcatttttat | gtttcagggt | cagggggaga | tgtgggaggt | tttttaaagc | aagtaaaacc | 1860 |
| tctacaaatg | tggtaaaaatc | cgataaggat | cgatccgggc | tggcgttaata | gcgaagaggc | 1920 |
| ccgcaccgat | cgcccttccc | aacagttgcg | cagcctgaat | ggcgaatgga | cgcgcctgt | 1980 |
| agcggcgcat | taagcggggc | gggtgtggtg | gttacgcgca | gcgtgaccgc | tacacttgcc | 2040 |
| agcgcctag | cgcccgctcc | tttcgcttcc | ttcccttcc | ttctcgccac | gttcgcgggc | 2100 |
| tttccccgtc | aagctctaaa | tggggggctc | ccttttaggt | tccgatttag | agctttacgg | 2160 |
| cacctcgacc | gcaaaaaact | tgatttgggt | gatgggtcac | gtagtgggccc | atcgccctga | 2220 |
| tagacgggtt | ttcgcccttt | gacgttggag | tccacgttct | ttaatagtgg | actcttggtc | 2280 |
| caaacctggaa | caacactcaa | ccttatctcg | gtctattctt | ttgatttata | agggattttg | 2340 |
| ccgatttcgg | cctattgggt | aaaaaatgag | ctgatttaac | aaatatttaa | cggaattttt | 2400 |
| aacaaaatat | taacgtttac | aatttcgct | gatgcgggat | tttctcctta | cgcactctgt | 2460 |
| cggtatttca | caccgcatac | gcggtatctg | gcagcaccat | ggcctgaaat | aacctctgaa | 2520 |
| agaggaaactt | ggtttaggtac | cctctgaggc | ggaaagaacc | agctgtggaa | tgtgtgtcag | 2580 |
| ttaggglytg | gaaagtcccc | aggctcccc | gcaggcagaa | gtatgcaaag | catgcatctc | 2640 |
| aattagttag | caaccagggtg | tggaaagtcc | ccaggcctcc | cagcaggcag | aagtatgcaa | 2700 |
| agcatgcac | tcaattagtc | agcaaccata | gtcccgcccc | taactccgccc | catcccgccc | 2760 |
| ctaactccgc | ccagttccgc | ccattctccg | ccccatggct | gactaatttt | ttttatttat | 2820 |
| gcagaggccg | aggccgcctc | ggcctctgag | ctattccaga | agtagtgagg | aggctttttt | 2880 |
| ggaggcctag | gcttttgcaa | aaagcttgat | tcttctgaca | caacagtctc | gaacttaagg | 2940 |
| ctagagccac | catgattgaa | caagatggat | tgcacgcagg | ttctccggcc | gcttgggtgg | 3000 |
| agaggctatt | cggtatgac | tgggcacaa | agacaatcgg | ctgctctgat | gccgcctgt | 3060 |
| tcgggtgtc | agcgcagggg | cgcccggttc | tttttgtcaa | gaccgacctg | tcgggtgccc | 3120 |
| tgaatgaaat | gcaggacgag | gcagcgggc | tatctgggt | ggccacgacg | ggcgcttctt | 3180 |
| gcgcagctgt | gctcgacgtt | gtcactgaag | cggaagggga | ctggctgcta | ttgggcgaag | 3240 |
| tgcgggggca | ggatctcctg | tcactccacc | ttgctcctgc | cgagaaagta | tcacatcatg | 3300 |
| ctgatgcaat | gcggcggtctg | catacgcttg | atccggctac | ctgcccattc | gaccaccaag | 3360 |
| cgaaacatcg | catcgagcga | gcacgtactc | ggatgggaagc | cggtcttgct | gatcaggatg | 3420 |
| atctggacga | agagcatcag | gggtcgcgc | cagccgaact | gttcgccagg | ctcaaggcgc | 3480 |
| gcctgcccga | cggcgaggat | ctcgttgtga | cccattggcga | tgctgtcttg | ccgaatatca | 3540 |
| tgggtgaaaa | tggccgcttt | tctggattca | tcgactgtgg | ccggctgggt | ttggcggaac | 3600 |
| gctatcagga | catagcgttg | gctaccctg | atattgctga | agagcttggc | ggcgaatggg | 3660 |
| ctgaccgctt | cctcgtgctt | tacgggtatc | ccgtcccgga | ttcgcagcgc | atcgccctct | 3720 |
| atcgccctct | tgacgagttc | ttctgagcgg | gactctgggg | ttcgaaatga | ccgaccaagc | 3780 |
| gacgcccac | ctgccatcac | gatggccgca | ataaaatata | tttattttca | ttacatctgt | 3840 |
| gtgttggttt | tttgtgtgaa | tcgatagcga | taaggatccg | cgtatgggtc | actctcagta | 3900 |
| caatctgctc | tgatgcccga | tagttaagcc | agccccgaca | cccgccaaca | cccgctgacg | 3960 |
| cgccctgacg | ggcttgctcg | ctcccgcat | ccgcttacag | acaagctgtg | accgtctccg | 4020 |
| ggagctgcat | gtgtcagagg | ttttcacctg | catcacggaa | acgcgcgaga | cgaaagggcc | 4080 |
| tcgtgatacg | cctattttta | taggttaatg | tcattgataat | aatgggttct | tagacgtcag | 4140 |
| gtggcacttt | tgggggaaat | gtgcgcggaa | ccctattttg | tttatttttc | taaatacatt | 4200 |
| caaatatgta | tccgctcatg | agacaataac | cctgataaat | gcttcaataa | tattgaaaaa | 4260 |
| ggaagagtat | gagtattcaa | catttccgtg | tgcgccctat | tccctttttt | ggggcatttt | 4320 |
| gccttctctg | ttttgtctac | ccagaaaacg | tgggtgaaat | aaaagatgct | gaagatcagt | 4380 |
| tgggtgcacg | agtgggttac | atcgaaactg | atctcaacag | cggtaagatc | cttgagagtt | 4440 |
| ttcgccccga | agaacgtttt | ccaatgatga | gcacttttaa | agttctgcta | tgtggcgccg | 4500 |
| tattatcccc | tattgacgcc | gggcaagagc | aactcggtcg | ccgcatacac | tattctcaga | 4560 |
| atgacttggg | tgagtactca | ccagtccacg | aaaagcatct | tacggatggc | atgacagtaa | 4620 |
| gagaattatg | cagtgtctgc | ataaccatga | gtgataaac | tgcggccaac | ttacttctga | 4680 |
| caacgatcgg | aggaccgaag | gagctaaccg | ctttttttgca | caacatgggg | gatcatgtaa | 4740 |
| ctcgccctga | tcgttgggaa | ccggagctga | atgaagccat | accaaaccgac | gagcgtgaca | 4800 |
| ccacgatgcc | tgtagcaatg | gcaacaacgt | tgcgcaaac | attaactggc | gaactactta | 4860 |
| ctctagcttc | ccggcaacaa | ttaatagact | ggatggaggg | ggataaagtt | gcaggaccac | 4920 |
| ttctgcgctc | ggcccttccg | gctggctggg | ttattgtctga | taaatctgga | gccggtgagc | 4980 |
| gtgggtctcg | cggtatcatt | gcagcactgg | ggccagatgg | taagccctcc | cgtatcgtag | 5040 |
| ttatctacac | gacggggagt | caggcaacta | tggatgaacg | aaatagacag | atcgctgaga | 5100 |
| taggtgctc | actgattaa | cattggtaac | tgtcagacca | agtttactca | tatatacttt | 5160 |
| agattgatgt | aaaacttcat | ttttaattta | aaaggatcta | ggtgaagatc | ctttttgata | 5220 |
| atctctacac | caaaatccct | taacgtgagt | tttcgttcca | ctgagcgtca | gaccccgtag | 5280 |
| aaaagatcaa | aggatcttct | tgagatcctt | ttttctcgcg | cgtaactctg | tgcttgcaaa | 5340 |
| caaaaaaacc | accgctacca | gcgggtgggt | gtttgcggga | tcaagagcta | ccaactcttt | 5400 |
| ttccgaagg | aactggcttc | agcagagcgc | agataccaaa | tactgtcctt | ctagtgtagc | 5460 |
| cgtagttagg | ccaccacttc | aagaactctg | tagcacccgc | tacatacctc | gctctgctaa | 5520 |

ES 2 618 508 T3

```

tcctggttacc agtgggtgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 5580
gacgatatgtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 5640
ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa 5700
gcgccaogct tcccgaaggc agaaaggcgg acaggatcc ggtaagcggc agggtcggaa 5760
caggagagcg cacgagggag cttccaggcg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 5820
ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggc gggcggagcc 5880
tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct gcccttttgc tggccttttg 5940
ctcacatggc tcgacagatc t                                     5961

```

<210> 15
 <211> 4307
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> *gag-pol* de VIH con codones optimizados

<400> 15

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| atggggcgccc | gcgccagcgt | gctgtcgggc | ggcgagctgg | accgctggga | gaagatccgc | 60 |
| ctggcccccg | gcgggcaaaaa | gaagtacaag | ctgaagcaca | tcgtgtgggc | cagccgcgaa | 120 |
| ctggagcgct | tcgcccgtgaa | ccccgggctc | ctggagacca | gcgaggggtg | ccgccagatc | 180 |
| ctcggccaaac | tgcagcccag | cctgcaaaacc | ggcagcgagg | agctgcgcag | cctgtacaac | 240 |
| accgtggcca | cgctgtactg | cgccaccag | cgcatcgaaa | tcaaggatac | gaaagaggcc | 300 |
| ctggataaaa | tcgaagagga | acagaataag | agcaaaaaga | aggcccaaca | ggccgcgcgc | 360 |
| gacaccggac | acagcaacca | ggtcagccag | aactacccca | tcgtgcagaa | catccagggg | 420 |
| cagatggtgc | accaggccat | ctccccccgc | acgctgaacg | cctgggtgaa | ggtggtggaa | 480 |
| gagaaggctt | ttagcccgga | ggtgataccc | atgttctcag | ccctgtcaga | gggagccacc | 540 |
| ccccaaagatc | tgaacaccat | gctcaacaca | gtggggggac | accaggccgc | catgcagatg | 600 |
| ctgaaggaga | ccatcaatga | ggaggctgcc | gaatgggatc | gtgtgcatcc | ggtgcacgca | 660 |
| ggggcccatcg | caccgggcca | gatgcgtgag | ccacggggct | cagacatcgc | cggaacgact | 720 |
| agtacccttc | aggaaacagat | cgctgggatg | accaacaacc | cacccatccc | ggtgggagaa | 780 |
| atctacaaac | gctggatcat | cctgggcctg | aacaagatcg | tgcgcagtga | tagccctacc | 840 |
| agcatcctgg | acatccgcca | aggcccgaa | gaacctttc | gcgactacgt | ggaccgggtc | 900 |
| tacaaaacgc | tcgcgcgca | gcaggctagc | caggaggtga | agaactggat | gaccgaaacc | 960 |
| ctgctgggtcc | agaacgcgaa | cccggactgc | aagacgatcc | tgaaggccct | ggggccagcg | 1020 |
| gctaccctag | aggaaatgat | gaccgcctgt | cagggagtgg | gcggaccceg | ccacaaggca | 1080 |
| cgcgctcctgg | ctgaggccat | gagccagggtg | accaactccg | ctaccatcat | gatgcagcgc | 1140 |
| ggcaactttc | ggaaccaacg | caagatcgtc | aagtgtttca | actgtggcaa | agaagggcac | 1200 |
| acagcccgca | actgcagggc | ccctaggaaa | aagggctggt | ggaaatgtgg | aaagggaagg | 1260 |
| caccaaataga | aagattgtac | tgagagacag | gctaattttt | tagggaagat | ctggccttcc | 1320 |
| cacaaggga | ggccaggga | ttttcttcag | agcagaccag | agccaacagc | cccaccagaa | 1380 |
| gagagcttca | ggtttgggga | agagacaaca | actccctctc | agaagcagga | gccgatagac | 1440 |
| aagggaactgt | atccttttagc | ttccctcaga | tcactctttg | gcagcgaccc | ctcgtcacaa | 1500 |
| taaagatagg | ggggcgactc | aaggaggctc | tcctggacac | cggagcagac | gacaccgtgc | 1560 |
| tggaggagat | gtcgttgcca | ggccgctgga | agccgaagat | gacgggggga | atcggcggtt | 1620 |
| tcataaagg | gcgccagtat | gaccagatcc | tcacgaaat | ctgcggccac | aaggctatcg | 1680 |
| gtaccgtgct | ggtgggcccc | acaccgctca | acatcatcgg | acgcaacctg | ttgacgcaga | 1740 |
| tcggttgca | gctgaacttc | cccattagcc | ctatcgagac | ggtaccgggtg | aagctgaagc | 1800 |
| ccgggatgga | cggcccgaag | gtcaagcaat | ggccattgac | agaggagaag | atcaaggcac | 1860 |
| tgggtggagat | ttgcacagag | atggaaaagg | aagggaata | ctccaagatt | gggcctgaga | 1920 |
| accggtacaa | cacgcccgtg | ttcgcaatca | agaagaagga | ctcgacgaaa | tggcgcaagc | 1980 |
| tgggtggactt | ccgcgagctg | aacaagcgca | cgcaagactt | ctgggaggtt | cagctgggca | 2040 |
| tcccgcaccc | cgcagggtcg | aagaagaaga | aatccgtgac | cgtactggat | gtgggtgatg | 2100 |
| cctactttctc | cgttcccctg | gacgaagact | tcaggaagta | cactgccttc | acaatccctt | 2160 |
| cgatcaacaa | cgagacaccg | gggattcgat | atcagtacaa | cgtgctgccc | cagggctgga | 2220 |
| aaggctctctc | cgcaatcttc | cagagtagca | tgacaaaat | cctggagcct | ttccgcaaac | 2280 |
| agaaccccgga | catcgtcatc | tatcagtaca | tggatgactt | gtacgtgggc | tctgatctag | 2340 |
| agatagggca | gcaccgcacc | aagatcgagg | agctgcgcca | gcacctgttg | aggtggggac | 2400 |
| tgaccacacc | cgacaagaag | caccagaagg | agcctccctt | cctctggatg | ggttacgagc | 2460 |
| tgcaccctga | caaatggacc | gtgcagccta | tcgtgctgcc | agagaaagac | agctggactg | 2520 |
| tcaacgacat | acagaagctg | gtggggaagt | tgaactgggc | cagtcagatt | taccagggga | 2580 |
| ttaagggtgag | gcagctgtgc | aaactcctcc | gcggaaccaa | ggcactcaca | gaggtgatcc | 2640 |
| ccctaaccga | ggaggccgag | ctcgaactgg | cagaaaaccg | agagatccta | aaggagcccc | 2700 |

```

tgcacggcgt gtactatgac cctccaaagg acctgatcgc cgagatccag aagcaggggc 2760
aaggccagtg gacctatcag atttaaccagg agcccttcaa gaacctgaag accggcaagt 2820
acgccgggat gaggggtgcc cacactaacg acgtcaagca gctgaccgag gccgtgcaga 2880
agatcaccac cgaaagcatc gtgatctggg gaaagactcc taagttcaag ctgcccattc 2940
agaaggaaac ctgggaaacc tgggtggacag agtattggca ggccacctgg attcctgagt 3000
gggagttcgt caacacccct cccctgggtga agctgtggta ccagctggag aaggagocca 3060
tagtgggcgc cgaaaccttc tacgtggatg gggccgctaa caggagagact aagctgggca 3120
aagccggata cgtcactaac cggggcagac agaaggttgt caccctcact gacaccacca 3180
accagaagac tgagctgcag gccatttacc tcgctttgca ggactcgggc ctggaggtga 3240
acatcgtgac agactctcag tatgccctgg gcattcattca agcccagcca gaccagagtg 3300
agtccgagct ggtcaatcag atcatcgagc agctgatcaa gaaggaaaag gtctatctgg 3360
cctgggtacc cgcccacaaa ggcattggcg gcaatgagca ggtcgacaag ctggtctcgg 3420
ctggcatcag gaaggtgcta ttccctggatg gcattcgacaa ggcccaggac gagcacgaga 3480
aataccacag caactggcgg gccatggcta gcgacttcaa cctgcccctt gtggtggcca 3540
aagagatcgt ggccagctgt gacaagtgtc agctcaaggc cgaagccatg catggccagg 3600
tggaactgtg ccccggcata tggcaactcg attgcaccca tctggagggc aaggttatcc 3660
tggtagccgt ccatgtggcc agtggctaca tcgaggccga ggtcattccc gccgaaacag 3720
ggcaggagac agcctacttc ctccctgaagc tggcaggccg gtggccagtg aagaccatcc 3780
atactgacaa tggcagcaat ttcaccagtg ctacggttaa ggccgcctgc tgggtggcgg 3840
gaatcaagca ggagttcggg atcccttaca atcccagag tcagggcgtc gtcgagtcta 3900
tgaataagga gttaaagaa attatcggcc aggtcagaga tcaggctgag catctcaaga 3960
ccgcgggtcca aatggcggta ttcatccaca atttcaagcg gaaggggggg attgggggggt 4020
acagtgcggg ggagcggatc gtggacatca tcgcgaccga catccagact aaggagctgc 4080
aaaagcagat taccaagatt cagaatttcc gggctacta cagggacagc agaaatcccc 4140
tctggaaagg cccagcgaag ctccctctgga aggggtgaggg ggcagtagtg atccaggata 4200
atagcgacat caaggtggtg ccagaagaa aggcgaagat cattagggat tatggcaaac 4260
agatggcggg tgatgattgc gtggcgagca gacaggatga ggattag 4307

```

<210> 16
 <211> 4658
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> *gag-pol* de EIAV con codones optimizados

<400> 16

ES 2 618 508 T3

```

atggggcgatc cccctcacctg gtccaaagcc ctgaagaaac tggaaaaagt caccggttcag 60
ggtagccaaa agcttaccac aggcaattgc aactgggcat tgtccctggg ggatcttttc 120
cacgacacta atttcgttaa ggagaaagat tggcaactca gagacgtgat cccctctttg 180
gaggacgtga cccaaacatt gtctgggcag gaggcggaag ctttcgagcg cacctgggtg 240
gccatcagcg cagtcaaaat ggggctgcaa atcaacaacg tggttgacgg taaagctage 300
tttcaactgc tccgcgctaa gtacgagaag aaaaccgcc acaagaaaca atccgaacct 360
agcgaggagt acccaattat gatcgacggc gccggcaata ggaacttccg cccactgact 420
cccaggggct ataccacctg ggtcaacacc atccagacaa acggactttt gaacgaagcc 480
tcccagaacc tgttcggcat cctgtctgtg gactgcacct ccgaagaaat gaatgctttt 540
ctcgacgtgg tgccaggaca ggctggacag aaacagatcc tgctcgatgc cattgacaag 600
atcgccgacg actgggataa tcgccacccc ctgcccacac cccctctggg ggctccccc 660
cagggggcta tccctatgac cgctaggttc attaggggac tgggggtgcc ccgcgaacgc 720
cagatggagc cagcatttga ccaatttagg cagacctaca gacagtggat catcgaagcc 780
atgagcgagg ggattaaagt catgatcgga aagcccaagg cacagaacat caggcagggg 840
gccaaaggaac cataccctga gtttgctgac aggtctctgt ccagattaa atccgaaggc 900
caccctcagg agatctccaa gttcttgaca gacacactga ctatccaaaa tgcaaataaa 960
gagtgcagaa acgccatgag gcacctcaga cctgaagata ccctggagga gaaaatgtac 1020
gcatgtcgcg acattggcac taccaagcaa aagatgatgc tgctcgccaa ggctctgcaa 1080
accggcctgg ctggtccatt caaaggagga gcaactgaag gaggtccatt gaaagctgca 1140
caaacatgtt ataattgtgg gaagccagga catttatcta gtcaatgtag agcacotaaa 1200
gtctgtttta aatgtaaaca gcctggacat ttctcaaagc aatgcagaag tgttccaaaa 1260
aacgggaagc aaggggctca agggaggccc cagaaacaaa ctttcccgat acaacagaag 1320
agtcagcaca acaaatctgt tgtacaagag actcctcaga ctcaaatct gtaccagat 1380
ctgagcgaaa taaaaaagga atacaatgtc aaggagaagg atcaagtaga ggatctcaac 1440
ctggacagtt tgtgggagta acatacaatc tcgagaagag gccactacc atcgctcctga 1500
tcaatgacac cctcttaat gtgctgctgg acaccggagc cgacaccago gttctcacta 1560

```

```

ctgctcacta taacagactg aaatacagag gaaggaaata ccagggcaca ggcacatcgc 1620
gcgttggagg caacgtcgaa accttttcca ctccgtgcac catcaaaaag aaggggagac 1680
acattaaaac cagaatgctg gtcgcccaga tcccgtcac catccttggc agagacattc 1740
tccaggacct gggcgctaaa ctctgctggg cacaactgtc taaggaaaac aagttccgca 1800
agatcgagct gaaagagggc acaatgggtc caaaaatccc ccagtggccc ctgaccaaag 1860
agaagcttga gggcgctaa gaaatcgtgc agcgctgtct ttctgagggc aagattagcg 1920
agggcagcga caataacctt tacaacagcc ccattcttgt gattaagaaa agggagcgga 1980
aatggagact cctgcaggac ctgaggggaa tcaacaagac cgtccaggtc ggaactgaga 2040
tctctcggcg actgcctcac cccggcgggc tgattaaatg caagcacatg acagtccctg 2100
acattggaga cgcttatttt accatccccc tccatcctga atttcgcccc tatactgctt 2160
ttaccatccc cagcatcaat caccaggagc ccgataaacg ctatgtgtgg aagtgcctcc 2220
cccagggatt tgtgcttagc cctacattt accagaagac acttcaagag atcctccaac 2280
ctttccgcca aagatacca gaggttcaac tctaccaata tatggacgac ctgttcatgg 2340
gggtccaacg gtctaagaag cagcacaagg aactcatcat cgaactgagg gcaatcctcc 2400
tggagaaagg cttcgagaca cccgacgaca agctgcaaga agttcctcca tatagctggc 2460
tgggctacca gctttgccct gaaaactgga aagtcagaaa gatgcagttg gatatggcca 2520
agaacccaac actgaacgac gtccagaagc tcatgggcaa tattacctgg atgagctccg 2580
gaatccctgg gcttacggtt aagcacattg ccgcaactac aaaaggatgc ctggagttga 2640
ttaagaaggt catttggaca gaggaagctc agaaggaact ggaggagaat aatgaaaaga 2700
accagaatgc tcaagggctc caatactaca atcccgaaga agaaatgttg tgcgaggtcg 2760
aaatcactaa gaactacgaa gccacctatg tcatcaaaac gtcccaggc atcttgtggg 2820
ccggaaagaa aatcatgaag gccacaacaa gctgggtccac cgttaaaaat ctgatgctcc 2880
tgctccagca cgtcgccacc gagtctatca cccgcgtcgg caagtgcctc accttcaaa 2940
ttcccttcac taaggagcag gtgatgtggg agatgcaaaa aggttggtac tactcttggc 3000
ttcccgagat cgtctacacc caccaagtgg tgcacgacga ctggagaatg aagcttgtcg 3060
aggagcccac tagcggaatt acaatctata ccgacggcgg ccaagcaaaa gaggtcggc cctgtcactc 3120
tcgctgcata cgtcacatct aacggccgca ccaagcaaaa gaggtcggc cctgtcactc 3180
accaggttgc tgagaggatg gctatccaga ttggccttga ggacactaga gacaagcagg 3240
tgaacattgt gactgacagc tactactgct ggaaaaacat cacagagggc cttggcctgg 3300
agggacccca gtctccctgg tggcctatca tccagaatat ccgcgaaaag gaaattgtct 3360
atttcgcttg ggtgccttga cacaaggaa tttacggcaa ccaactcgcc gatgaagccg 3420
ccaaaattaa agaggaaatc atgcttgcct accagggcac acagattaag gagaagagag 3480
acgaggacgc tggctttgac ctgtgtgtgc catacgacat catgattccc gttagcgaca 3540
caaagatcat tccaacggat gtcaagatcc aggtgccacc caattcattt ggttgggtga 3600
ccggaaagtc cagcatggct aagcagggtc ttctgattaa cgggggaatc attgatgaag 3660
gatacacccg cgaaatccag gtgatctgca caaatatcgg caaaagcaat attagctta 3720
tcgaaggcca gaagtctgt caactcatca tctccagca ccacagcaat tcaagacaac 3780
cttgggacga aaacaagatt agccagagag gtgacaaggc cttcggcagc acaggtgtgt 3840
tctgggttga gaacatccag gaagcacagg acgagcacga gaattggcac acctccccta 3900
agatttttgg ccgcaattac aagatcccac tgactgtggc taagcagatc acacaggaat 3960
gccccactg caccaaaaca ggttcttggc ccgcggctg cgtgatgagg tcccccaatc 4020
actggcaggc agattgcacc cacctcgaca acaaaattat cctgaccttc gtggagagca 4080
attccggcta catccacgca acactcctct ccaaggaaaa tgcattgtgc acctccctcg 4140
caattcttga atgggcccag ctgttctctc caaaatccct gcacaccgac aacggcacca 4200
actttgttgc tgaacctgtg gtgaatctgc tgaagtctct gaaaatcgcc cacaccactg 4260
gcattcccta tcacctgaa agccagggca ttgtcgagag ggccaacaga actctgaaa 4320
aaaagatcca atctcacaga gacaatacac agacatttga ggccgcactt cagctcgccc 4380
ttatcacctg caacaaagga agagaaagca tggggcgcca gaccccttgg gaggtcttca 4440
tactaacca ggcccaggc atccatgaaa agctgctctt gcagcaggcc cagtcctcca 4500
aaaagttctg cttttataag atcccgggtg agcacgactg gaaaggctct acaagagttt 4560
tgttgaaagg agacggcgca gttgtggtga acgatgaggg caaggggata atcgctgtgc 4620
ccctgacacg caccaagctt ctcacaaagc caaactga 4658

```

<210> 17
 <211> 10392
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> pIRESIhygESYNGP

 <400> 17

aattcgccac catgggggat cccctcacct ggtccaaagc cctgaagaaa ctggaaaaag 60

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tcaccgtttca | gggtagccaa | aagcttacca | caggcaattg | caactgggca | ttgtccctgg | 120 |
| tggatctttt | ccacgacact | aatttcgtta | aggagaaaga | ttggcaactc | agagacgtga | 180 |
| tccccctctt | ggaggacgtg | acccaaacat | tgtctgggca | ggagcgcgaa | gctttcgagc | 240 |
| gcacctggtg | ggccatcagc | gcagtcacaa | tggggctgca | aatcaacaac | gtgggtgacg | 300 |
| gtaaagctag | ctttcaactg | ctccgcgcta | agtacgagaa | gaaaaccgcc | aacaagaaac | 360 |
| aatccgaacc | tagcgaggag | tacccaatta | tgatcgacgg | cgcgcgcaat | aggaacttcc | 420 |
| gcccactgac | tcccaggggc | tataccacct | gggtcaaacac | catccagaca | aacggacttt | 480 |
| tgaacgaagc | ctcccagaac | ctgttcggca | tccgtgtctgt | ggactgcacc | tccgaagaaa | 540 |
| tgaatgcttt | tctcgacgtg | gtgccaggac | aggctggaca | gaaacagatc | ctgctcgatg | 600 |
| ccattgacaa | gacgcgcgac | gactgggata | atcgccaccc | cctgccaaac | gccccctctg | 660 |
| tggctcccc | acaggggcct | atccctatga | cgcgtagggt | cattaggggga | ctgggggtgc | 720 |
| cccgcgaaac | ccagatggag | ccagcatttg | accaatttag | gcagacctac | agacagtggg | 780 |
| tcacggaagc | catgagcgag | gggattaaag | tcattgatcgg | aaagcccaag | gcacagaaca | 840 |
| tcaggcaggg | ggccaaggaa | ccataccctg | agttttgtcga | caggcttctg | tcccagatta | 900 |
| aatccgaagg | ccaccctcag | gagatctcca | agttcttgac | agacacactg | actatccaaa | 960 |
| atgcaaatga | agagtgcaga | aacgccatga | ggcacctcag | acctgaagat | accctggagg | 1020 |
| agaaaatgta | cgcattgtcg | gacattggca | ctaccaagca | aaagatgatg | gccccctctg | 1080 |
| aggtctctga | aaccggcctg | gctgggtccat | tcaaaggagg | agcactgaag | ggaggtccat | 1140 |
| tgaagctgc | acaaacatgt | tataattgtg | ggaagccagg | acatttatct | agtcaatgta | 1200 |
| gagcacctaa | agtctgtttt | aaatgtaaac | agcctggaca | ttctccaaag | caatgcagaa | 1260 |
| gtgttccaaa | aaacgggaag | caaggggctc | aagggaggcc | ccagaaacaa | actttcccca | 1320 |
| tacaacagaa | gagtcagcac | aacaaatctg | ttgtacaaga | gactcctcag | actcaaaatc | 1380 |
| tgtacccaga | tctgagcgaa | ataaaaaagg | aatacaatgt | caaggagaag | gatcaagtag | 1440 |
| aggatctcaa | cctggacagt | ttgtgggagt | aacatacaat | ctcgagaaga | ggcccaactac | 1500 |
| catcgtcctg | atcaatgaca | ccccctctaa | tgtgctgctg | gacacoggag | ccgacaccag | 1560 |
| cgttctcact | actgctcact | ataacagact | gaaatacaga | ggaaggaaat | accagggcac | 1620 |
| aggcatcctc | ggcgttggag | gcaacgtcga | aactctttcc | actcctgtca | ccatcaaaaa | 1680 |
| gaaggggaga | cacattaaaa | ccagaatgct | ggtcgcgcgac | atccccgtca | ccatccttgg | 1740 |
| cagagacatt | ctccaggacc | tgggcgctaa | actcgtgctg | gcacaaactgt | ctaaggaaat | 1800 |
| caagttccgc | aagatcgagc | tgaagagggg | cacaatgggt | ccaaaaatcc | cccagtgggc | 1860 |
| cctgacccaa | gagaagcttg | agggcgctaa | ggaaaatcgtg | cagcgcctgc | ttctctgagg | 1920 |
| caagattagc | gaggccagcg | acaataaccc | ttacaacagc | cccatctttg | tgattaagaa | 1980 |
| aaggagcggc | aaatggagac | tccgtcagga | cctgagggaa | ctcaacaaga | ccgtccaggt | 2040 |
| cggaaactgag | atctctcgcg | gactgcctca | ccccggcggc | ctgattaaat | gcaagcacat | 2100 |
| gacagtcctt | gacattggag | acgcttattt | taccatcccc | ctcgatcctg | aatttcgccc | 2160 |
| ctatactgct | tttaccatcc | ccagcatcaa | tcaccaggag | cccgataaac | gctatgtgtg | 2220 |
| gaagtgcctc | ccccagggat | ttgtgcttag | ccctacatt | taccagaaga | cacttcaaga | 2280 |
| gatcctccaa | cttttccgcg | aaagataccc | agaggttcaa | ctctaccaat | atatggacga | 2340 |
| cctgttcatg | gggtccaacg | ggtctaagaa | gcagcacaa | gaactcatca | togaactgag | 2400 |
| ggcaatcctc | ctggagaaag | gcttcgagac | accgacgac | aagctgcaag | aagttccctc | 2460 |
| atatagctgg | ctgggctacc | agctttgccc | tgaaaaactgg | aaagtccaga | agatgcagtt | 2520 |
| ggatatggtc | aagaacccaa | cactgaacga | cgtccagaag | ctcatgggca | atattacctg | 2580 |
| gatgagctcc | ggaatccctg | ggettaccgt | taagcacatt | gccgcaacta | caaaaaggatg | 2640 |
| cctggagttg | aaccagaagg | tcatttggac | agaggaagct | cagaaggaa | tggaggagaa | 2700 |
| taatgaaaag | attaagaatg | ctcaagggtc | ccaatactac | aatcccgaa | aagaaatgtt | 2760 |
| gtgcgaggtc | gaaatcacta | agaactacga | agccacctat | gtcatcaaac | agtcccaagg | 2820 |
| catcttgttg | gccggaaaga | aaatcatgaa | ggccaacaaa | ggctgggtcca | ccgttaaaaa | 2880 |
| tctgatgctc | ctgctccagc | acgtcgccac | cagctctatc | acccgcgtcg | gcaagtgcgc | 2940 |
| caccttcaaa | gttcccttca | ctaaggagca | ggtgatgtgg | gagatgcaaa | aaggctggta | 3000 |
| ctactcttgg | cttcccagaga | tctctacac | ccaccaagtg | gtgcacgacg | actggagaat | 3060 |
| gaagcttgtc | gaggagccca | ctagcggaat | tacaatctat | accgacggcg | gaaagcaaaa | 3120 |
| cggagagggg | atcgtgcac | acgtcacatc | taacggccgc | accaagcaaa | agaggctcgg | 3180 |
| cctgtcact | caccaggtgg | ctgagaggat | ggctatccag | atggcccttg | aggacactag | 3240 |
| agacaagcag | gtgaacattg | tgactgacag | ctactactgc | tggaaaaaca | tcacagaggg | 3300 |
| ccttggcctg | gagggacccc | agtctccctg | gtggcctatc | atccagaata | tccgcgaaaa | 3360 |
| ggaaattgtc | tatttcgect | gggtgcctgg | acacaaagga | atttacggca | accaactcgc | 3420 |
| cgatgaagcc | gccaaaattt | aagaggaat | catgcttgcc | taccagggca | cacagattaa | 3480 |
| ggagaagaga | acgaggacg | ctggctttga | cctgtgtgtg | ccatacgaca | tcatgattcc | 3540 |
| cgttagcgac | acaaagatca | ttccaaccga | tctcaagatc | caagtgccac | ccaattcatt | 3600 |
| tggttgggtg | accggaaagt | ccagcatggc | taagcagggt | cttctgatta | acgggggaat | 3660 |
| cattgatgaa | ggatacaccc | gcgaaatcca | ggtgatctgc | acaaatatcg | gcaaaagcaa | 3720 |
| tattaagctt | atcgaagggc | agaagttcgc | tcaactcatc | atcctccagc | accacagcaa | 3780 |
| ttcaagacaa | ccttgggacg | aaaacaagat | tagccagaga | ggtgacaagg | gcttcggcag | 3840 |
| cacaggtgtg | ttctgggtgg | agaacatcca | ggaagcacag | gacgagcag | agaattggca | 3900 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cacctccct | aagattttgg | cccgcaatta | caagatccca | ctgactgtgg | ctaagcagat | 3960 |
| cacacaggaa | tgccccact | gcaccaaaca | aggttctggc | cccgccggct | gcgtgatgag | 4020 |
| gtccccaat | cactggcagg | cagattgcac | ccacctcgac | aacaaaatta | tcctgacctt | 4080 |
| cgtggagagc | aattccggct | acatccacgc | aacactcctc | tccaaggaaa | atgcattgtg | 4140 |
| cacctccctc | gcaattctgg | aatgggcccag | gctgttctct | ccaaaatccc | tgcacaccga | 4200 |
| caacggcacc | aactttgtgg | ctgaacctgt | gggtgaatctg | ctgaagtctc | tgaaaatcgc | 4260 |
| ccacaccact | ggcattccct | atcacccctga | aagccagggc | attgtcgaga | gggccaacag | 4320 |
| aactctgaaa | gaaaagatcc | aatctcacag | agacaatata | cagacattgg | aggccgcact | 4380 |
| tcagctcgcc | cttatcacct | gcaacaaagg | aagagaaagc | atgggcccgc | agacccccctg | 4440 |
| ggaggtcttc | atcactaacc | aggcccaggt | catccatgaa | aagctgctct | tgcagcaggc | 4500 |
| ccagtcctcc | aaaaagttct | gctttttataa | gatccccggg | gagcacgact | ggaaaggctc | 4560 |
| tacaagagtt | ttgtggaaag | gagacggcgc | agttgtgggtg | aacgatgagg | gcaaggggat | 4620 |
| catcgctgtg | ccctgacac | gcaccaagct | tctcatcaag | ccaaactgaa | cccggggcgg | 4680 |
| ccgcactaga | ggaattcgcc | cctctccctc | ccccccccc | aacgttactg | gcccgaagccg | 4740 |
| cttggaaataa | ggccgggtgtg | tgtttgtcta | tatgtgattt | tccaccatat | tgcctctctt | 4800 |
| tggcaatgtg | agggcccggg | aacctggccc | tgtctctctg | acgagcattc | ctaggggtct | 4860 |
| ttccctctc | tccaaaggaa | tgcaaggctc | cttgaatgtc | gtgaagggaag | cagttccctc | 4920 |
| ggaagcttct | tgaagacaaa | caacgtctgt | agcgaccctt | tgcaggcagc | ggaaaccccc | 4980 |
| acctggcgac | aggtgcctct | gcggccaaaa | gccacgtgta | taagatacac | ctgcaaaggc | 5040 |
| ggcacaaccc | cagtgcacag | ttgtgagttg | gatagttgtg | gaaagagtca | aatggctctc | 5100 |
| ctcaagcgta | gtcaacaagg | ggctgaaggga | tgcccagaag | gtaccccatt | gtatgggaat | 5160 |
| ctgatctggg | gcctcggtgc | acatgcttta | catgtgttta | gtcgagggtta | aaaaagctct | 5220 |
| agggcccccg | aaccaagggg | acgtggtttt | cccttgaaaa | acacgatgat | agcttgcca | 5280 |
| caaccccgta | ccaaagatgg | atagatccgg | aaagcccgaa | ctcacccgga | cgtctgtcga | 5340 |
| gaagtttctg | atcgaaaagt | tcgacagcgt | ctccgacctg | atgcagctct | cggaggggcga | 5400 |
| agaatctcgt | gctttcagct | tcgatgtagg | agggcggtga | tatgtcctgc | gggtaaatag | 5460 |
| ctgcgcgat | ggtttctaca | aagatcggtta | tgtttatcgg | cactttgcat | cggccgcgct | 5520 |
| cccgattccg | gaagtgcctg | acattggggga | attcagcgag | agcctgacct | attgcatctc | 5580 |
| ccgcctgca | cagggtgtca | cgttgcaaga | cctgcctgaa | accgaactgc | ccgtgttct | 5640 |
| gcagccgggt | gcccaggcca | tggatgcgat | gcctgcggcc | gatcttagcc | agacgagcgg | 5700 |
| gttcggccca | ttcggaccgc | aaggaaatcgg | tcaatacact | acatggcggtg | atctctatag | 5760 |
| cgcgattgct | gatcccatg | tgtatcactg | gcaaactgtg | atggacgaca | ccgtcagtcg | 5820 |
| gtccgtcgcg | caggctctcg | atgagctgat | gctttggggc | gaggactgcc | ccgaagtccg | 5880 |
| gcacctcggtg | cacgcggatt | tcggctccaa | caatgtcctg | acggacaatg | gcgcataaac | 5940 |
| agcggtcatt | gactggagcg | aggcgatggt | cggggattcc | caatacagagg | tcgccaacat | 6000 |
| cttctctctg | aggccgtggg | tggcttgtat | ggagcagcag | acgcgctact | tcgagcggag | 6060 |
| gcactccggag | cttgccaggat | cgcgcgggt | ccgggcgtat | atgctccgca | ttggctcttg | 6120 |
| ccaactctat | cagagcttgg | ttgacggcaa | tttcgatgat | gcagcttggg | cgcagggctg | 6180 |
| atgcgacgca | atcgtccgat | ccggagccgg | gactgtcggg | cgtaacacaaa | tcgcccgcag | 6240 |
| aagcgcgggc | gtctggaccg | atggctgtgt | agaagtactc | gccgatagtg | gaaaccgcag | 6300 |
| cccagcact | cgtcggaggg | caaagggaata | gagtagatgc | cgaccgaaca | agagctgatt | 6360 |
| tcgagaacgc | ctcagccagc | aactcgcgcg | agcctagcaa | ggcaaattgcg | agagaacggc | 6420 |
| cttaocgttg | gtggcacagt | tctcgtccac | agttcgctaa | gctcgctcgg | ctgggtcgcg | 6480 |
| ggagggcggg | tcgcagtgat | tcaggccctt | ctggattgtg | ttggctccca | gggcacgatt | 6540 |
| gtcatgcccc | cgcactcggg | tgatctgact | gatccgcag | attggagatc | gcgcgcgtg | 6600 |
| cctgcgcatt | gggtgcagat | ctagagctcg | ctgatcagcc | tcgactgtgc | ctctagttgc | 6660 |
| cagccatctg | ttgtttgccc | ctccccctg | ccttccttga | ccctggaagg | tgcactccc | 6720 |
| actgtccttt | cctaataaaa | tgaggaaatt | gcacgcatt | gtctgagtag | gtgtcattct | 6780 |
| attctggggg | gtgggggtggg | gcaggacagc | aagggggagg | attgggaaga | caatagcagg | 6840 |
| catgctgggg | atgcgggtggg | ctctatggct | tctgaggcgg | aaagaaccag | ctggggctcg | 6900 |
| agtgcattct | agttgtgggt | tgcccaact | catcaatgta | tcttatcatg | tctgtatacc | 6960 |
| gtcgacctct | agctagagct | tggcgtaatc | atggtcatag | ctgtttcctg | tgtgaaattg | 7020 |
| ttatccgctc | acaattccac | acaacatacg | agccggaagc | ataaagtgtg | aagcctgggg | 7080 |
| tgctaatga | gtgagctaac | tcacattaat | tcggttgccg | tcactgcccg | ctttccagtc | 7140 |
| gggaaacctg | tcgtgccagc | tgcattaatg | aatcggccaa | cgcgcggggg | gaggcggttt | 7200 |
| gcgtattggg | cgtctctccg | cttccctcgt | cactgactcg | ctgcgctcgg | tcgttcggct | 7260 |
| gcggcgagcg | gtatcagctc | actcaaaggc | ggttaatacgg | ttatccacag | aatcagggga | 7320 |
| taacgcaggga | aagaacatgt | gagcaaaagg | ccagcaaaag | gccagggaac | gtaaaaaggc | 7380 |
| cgcgttgctg | gcgtttttcc | ataggctccg | ccccctgac | gagcatcaca | aaaatcgacg | 7440 |
| ctcaagtcag | aggtggcgaa | acccgacagg | actataaaga | taccaggcgt | ttccccctgg | 7500 |
| aagetccctc | gtgcgctctc | ctgttccgac | cctgcgcctt | accggatacc | tgtccgcctt | 7560 |
| tctccctctg | ggaagcgtgg | cgtttctca | atgctcacgc | tgtagggtatc | tcagttccgt | 7620 |
| gtaggctcgt | cgtcccaagc | tgggtgtgt | gcacgaaccc | ccggttcagc | ccgaccgctg | 7680 |
| cgccttatcc | ggtaactatc | gltcttgagtc | caacccggta | agacacgact | tatcgccact | 7740 |


```

ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcgggtg ctacagagtt 7800
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct 7860
gctgaagcca gttacottcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 7920
cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 7980
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg 8040
ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaatta 8100
aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg acagttacca 8160
atgcttaate agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc 8220
ctgactcccc gtctgttaga taactacgat acgggagggg ttaccatctg gcccagtg 8280
tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 8340
agcgggaagg gccgagcgca gaagtgggtc tgcaacttta tccgcctcca tccagctcat 8400
taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttccggcagt aatagtttgc gcaacgttgt 8460
tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctctgctgtt ggtatggctt cattcagctc 8520
cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag 8580
ctccttcggg cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt 8640
tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac 8700
tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg 8760
cccgcgctca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat 8820
tggaataact tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc 8880
gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc 8940
tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa 9000
atgttgaata ctcatactct tcttttttca atattattga agcatttatc agggttattg 9060
tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 9120
cacatttccc cgaaaagtgc caccgtacgt cgacggatcg ggagatctcc cgatccccta 9180
tgggtcgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcagatg taagccagta tctgctccct 9240
gcttgtgtgt tggaggtcgc tgagtagtgc gcgagcaaaa ttaagctac aacaaggcaa 9300
ggcttgaccg acaattgcat gaagaatctg cttagggtta ggcgttttgc gctgcttcgc 9360
gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagtattta atagtaatca 9420
attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta 9480
aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat 9540
gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga ctatttacgg 9600
taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac 9660
gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggcat tatgccagat acatgacctt atgggacttt 9720
cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccattggtgat gcggttttgg 9780
cagtacatca atgggcgtgg atagcgggtt gactcacggg gatttccaag tctccacccc 9840
attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt 9900
aacaactcgg ccccatggac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgggtgga ggtctatata 9960
agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga aattaatacg 10020
actcactata gggagaccca agcttgggtac cgagctcgga tccactagta acggccgcca 10080
gtgtgctgga attaatctgc tgtctgcgag ggccagctgt tggggtgagt actccctctc 10140
aaaagcgggc atgacttctg cgctaagatt gtcagtttcc aaaaacgagg aggatttgat 10200
attcacctgg ccgcgggtga tgcttttgag ggtggccgcg tccatctggg cagaaaagac 10260
aatctttttg ttgtcaagct tgaggtgtgg caggcttgag atctggccat acacttgagt 10320
gacaatgaca tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc actcccaggt ccaactgcag 10380
gtcgatcgag ca 10392

```

<210> 18
 <211> 10114
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pESDSYNGP

<400> 18

ES 2 618 508 T3

```

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccattgttggc attgattatt gactagttaa taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcttggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccaattggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaattg ccgccttggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

```

```

gcagtlacatc tacgtattag tcacgcctat taccatgggt atgcgggtttt ggcagtlacac 540
caatggggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac 780
agttaaattg ctaacgcagt cagtgccttc gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840
gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga cagggttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcggttc tgatagggac ctattggctc tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020
aggtgtccac tccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080
ataggctaga gaattccagg taagatgggc gatccctca cctgggtccaa agccctgaag 1140
aaactggaaa aagtcaccgt tcagggtagc caaaagctta ccacaggcaa ttgcaactgg 1200
gcattgtccc tgggtggatct tttccacgac actaatctcg ttaaggagaa agattggcaa 1260
ctcagagacg tgatcccccct cttggaggac gtgacccaaa cattgtctgg gcaggagcgc 1320
gaagctttcg agcgcacctg gtgggccatc agcgcagtca aaatggggct gcaaatcaac 1380
aacgtggttg acggtaaaagc tagctttcaa ctgctcccg ctaagtaga gaagaaaacc 1440
gccaacaaga aacaatccga acctagcgag ggtacccaa ttatgatcga cgggcgcggc 1500
aataggaact tccgcccact gactcccagg ggctatacca cctgggtcaa caccatccag 1560
acaaacggac ttttgaacga agcctcccag aacctgttcg gcctcctgtc tgtggactgc 1620
acctccgaag aaatgaatgc ttttctcgac gtggtgccag gacaggctgg acagaaacag 1680
atcctgctcg atgccattga caagatcgcc gacgactggg ataactcgca cccctgcca 1740
aacgcccctc tgggtggctcc ccacagggg cctatcccta tgaccgctag gticattagg 1800
ggactggggg tgccccgcga acgcccagat gagccagcat ttgaccaatt taggcagacc 1860
tacagacagt ggatcatcga agccatgagc gaggggatta aagtcatgat cggaaaagccc 1920
aaggcacaga acatcaggca gggggccaag gaaccatacc ctgagtttgt cgacaggctt 1980
ctgtcccaga ttaaatccga aggccaccct caggagatct ccaagttctt gacagacaca 2040
ctgactatcc aaaatgcaaa tgaagagtgc agaaacgcca tgaggcacct cagacctgaa 2100
gataccctgg aggagaaaat gtacgcattg cgcgacattg gcactaccaa gcaaaagatg 2160
atgctgctcg ccaaggtctc gcaaacccgc ctggctggtc cattcaaagg aggagcactg 2220
aaggagggtc cattgaaagc tgcacaaaca ttttataatt gtgggaagcc aggcatttta 2280
tctagtcaat gtagagcacc taaagtctgt tttaaattga aacagcctgg acatttctca 2340
aagcaatgca gaagtgttcc aaaaaacggg aagcaagggg ctcaagggag gccccagaaa 2400
caacttttcc cgatacaaca gaagagtccg cacaacaaat ctgttgtaca agagactcct 2460
cagactcaaa atctgtaccc agatctgagc gaaataaaaa aggaatacaa tgtcaaggag 2520
aaggatcaag tagaggatct caacctggac agtttgtggg agtaacatac aatctcgaga 2580
agaggcccac taccatcgct ctgatcaatg acacccctct taatgtgctg ctggacaccg 2640
gagccgacac cagcgttctc actactgctc actataacag actgaaatac agaggaagga 2700
aataccaggg cacaggcatac atcggcgttg gaggcaacgt cgaaaccttt cccactcctg 2760
tcaccatcaa aaagaagggg agacacatta aaaccagaat gctggctcgc gacatccccg 2820
tcaccatcct tggcagagac atttctccag acctgggcgc taaactcgtg ctggcacaac 2880
tgtctaagga aatcaagtcc cgcaagatcg agctgaaaga gggcacaatg ggtccaaaaa 2940
tccccagtg gccctgacc aaagagaagc ttgagggcgc taaggaaatc gtgcagcgcc 3000
tgctttctga gggcaagatt agcagggcca gcgacaataa ccttacaac agccccatct 3060
ttgtgattaa gaaaaggagc ggcaaatgga gactcctgca ggacctgagg gaactcaaca 3120
agaccgttca ggctcggaact gagatctctc ceggactgcc tcaccccgcc ggcctgatta 3180
aatgcaagca catgacagtc cttgacattg gagacgctta ttttaccatc cccctcgatc 3240
ctgaatttcg cccctatact gcttttacca tcccagcat caatcaccag gagcccgata 3300
aacgctatgt gtggaagtgc ctccccagg gatttgtgct tagcccttac atttaccaga 3360
agacacttca agagatcctc caacctttcc gcgaaagata cccagagggt caactctacc 3420
aatatatgga cgacctgttc atgggggtcca acgggtctaa gaagcagcac aaggaactca 3480
tcacgaact gagggcaatc ctctggaga aaggcttcga gacaccgac gacaagctgc 3540
aagaagttcc tccatatagc tggtgggtc accagcttg cctgaaaac tggaaagtcc 3600
agaagatgca gttggatatg gtcaagaacc caactactga cgacgtccag aagctcatgg 3660
gcaatattac ctggatgagc tccggaatcc ctgggcttac cgttaagcac attgcccga 3720
ctacaaaagg atgcctggag ttgaaccaga aggtcatttg gacagaggaa gctcagaagg 3780
aactggagga gaataatgaa aagattaaga atgctcaagg gctccaatac tacaatcccg 3840
aagaagaaat gttgtgcgag gtcgaaatca ctaagaacta cgaagccacc tatgtcatca 3900
aacagtccca aggcatttg tgggcggaa agaaaatcat gaaggccaac aaaggctgc 3960
ccaccgttaa aaatctgatg ctctgtctcc agcacgtcgc caccgagtct atcacccgcg 4020
tcggcaagtg cccacacctc aaagtctcct tactaaggga gcagggtgatg tgggagatgc 4080
aaaaaggctg gtactactct tggcttcccg agatcgtcta caccaccaa gtggtgcacg 4140
acgactggag aatgaagctt gtcgaggagc ccactagcgg aattacaatc tataccgacg 4200
gcggaagca aaacggagag ggaatcgctg catacgtcac atctaaccggc cgcaccaagc 4260
aaaagaggct cggccctgtc actcaccagg tggctgagag gatggctatc cagatggccc 4320

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ttgaggacac | tagagacaag | caggtgaaca | ttgtgactga | cagctactac | tgctggaaaa | 4380 |
| acatcacaga | gggccttggc | ctggaggagc | cccagttctc | ctgggtggcc | atcatccaga | 4440 |
| atatccgcga | aaaggaaatt | gtctatttct | cctgggtgcc | tggaacacaa | ggaattttacg | 4500 |
| gcaaccaact | cgccgatgaa | gcccacaaa | taaagaggga | aatcatgctt | gcctaccagg | 4560 |
| gcacacagat | taaggagaag | agagacgagg | acgctggctt | tgacctgtgt | gtgccatagc | 4620 |
| acatcatgat | tcccgttagc | gacacaaaga | tcattccaac | cgatgtcaag | atccagggtgc | 4680 |
| cacccaattc | at ttgtgttg | gtgaccggaa | agtcacagcat | ggctaagcag | ggtctttctga | 4740 |
| ttaacggggg | aatcattgat | gaaggatata | ccggcgaaat | ccagggtgatc | tgcacaaata | 4800 |
| tccggcaaaag | caatattaag | cttatcgaa | ggcagaagtt | cgctcaactc | atcatectcc | 4860 |
| agcaccacag | caattcaaga | caaccttggg | acgaaaacaa | gatttagccag | agagggtgaca | 4920 |
| aggggttcgg | cagcacagg | gtgttctggg | tggaagaacat | ccaggaagca | caggacgagc | 4980 |
| acgagaattg | gcacacctcc | cctaagattt | tggcccgcaa | ttacaagata | ccactgactg | 5040 |
| tggctaagca | gatcacacag | gaatgcccc | actgcaccaa | acaaggttct | ggccccgcgc | 5100 |
| gctgcgtgat | gaggtcccc | aatcactggc | aggcagattg | caccacacct | gacaacaaaa | 5160 |
| ttatcctgac | cttcgtggag | agcaattccg | gctacatcca | cgcaacactc | ctctccaagg | 5220 |
| aaaatgcatt | gtgcacctcc | ctcgcaattc | tgggaatgggc | caggctgttc | tctccaaaat | 5280 |
| ccctgcacac | cgacaacggc | accaactttg | tggctgaacc | tgtggtgaat | ctgctgaagt | 5340 |
| tcttgaaatt | cgcccacacc | actggcattc | cctatcacc | tgaaagccag | ggcattgtctg | 5400 |
| agagggccaa | cagaactctg | aaagaaaaga | tccaatctca | acagagacaat | acacagacat | 5460 |
| tggaggccgc | acttcagctc | gcccattatc | cctgcaacaa | aggaagagaa | agcatgggcg | 5520 |
| gccagacccc | ctgggaggtc | ttcatcacta | accaggccca | ggatcatccat | gaaaagctgc | 5580 |
| tcttgacagca | ggcccagttc | tccaaaaagt | tctgctttta | taagatcccc | ggtgagcacg | 5640 |
| actggaaagg | tcttacaaga | gttttgtgga | aaggagacgg | cgcagttgtg | gtgaacgatg | 5700 |
| agggcaaggg | gatcatcgct | gtgcccctga | cacgcaccaa | gcttctcatc | aagccaaact | 5760 |
| gaaccggggg | cggccgcttc | ccttttagtga | gggttaatgc | ttcgagcaga | catgataaga | 5820 |
| tacattgatg | agtttggaca | aaccacaact | agaatgcagt | gaaaaaaatg | ctttatttgt | 5880 |
| gaaatttgtg | atgetattgc | tttatttgtt | accattataa | gctgcaataa | acaagttaac | 5940 |
| aacaacaatt | gcattcattt | tatgtttcag | gttcaggggg | agatgtggga | ggtttttttaa | 6000 |
| agcaagtaaa | acctctacaa | atgtgtgtaa | atccgataag | gatcgatccg | ggctggcgta | 6060 |
| atagegaaga | ggccgcaccc | gatcgccctt | cccaacagtt | gcgcagcctg | aatggcgaat | 6120 |
| ggaacgcgcc | tgtagcggcg | cattaagcgc | ggcgggtgtg | gtgggttaagc | gcagcgtgac | 6180 |
| cgtatcactt | gccagcgcct | tagcgcgcgc | tcccttcgct | ttcttccctt | cccttctcgc | 6240 |
| caagttcgcg | gcttttcccc | gtcaagctct | taactcgggg | ctccctttag | gctttccgatt | 6300 |
| tagagcttta | cggcacctcg | accgcaaaaa | acttgatttg | ggtgatgggt | cacgtagtgg | 6360 |
| gccatcgccc | tgatagacgg | tttttcgccc | tttgacgttg | gagtcacagt | tcttttaatag | 6420 |
| tggactcttg | ttccaaactg | gaacaacact | caaccctatc | tccgtctatt | cttttgattt | 6480 |
| ataagggtatt | ttgcgcgatt | cggcctattg | gttaaaaaat | gagctgattt | aacaaatatt | 6540 |
| taacgcgaat | tttaacaaaa | tattaaogtt | tacaatttct | cctgatgcgg | tattttctcc | 6600 |
| ttacgcactt | gtgcggtatt | tcacaccgca | tacgcggatc | tgcgcagcac | catggcctga | 6660 |
| aataacctct | gaaagaggaa | cttggttagg | taacctctga | ggcggaaaaga | accagctgtg | 6720 |
| gaatgtgtgt | cagttagggt | gtggaaagtc | ccaggtctcc | ccagcaggca | gaagtatgca | 6780 |
| aagcatgcat | ctcaattagt | cagcaaccag | gtgtggaaag | tccccaggct | ccccagcagg | 6840 |
| cagaagtatg | caaagcatgc | atctcaatta | gtcagcaacc | atagtcocgc | ccctaactcc | 6900 |
| gcccatcccg | cccttaactc | cgcacagttc | cgcacattct | ccgccccatg | gctgactaat | 6960 |
| tttttttatt | tatgcagagg | ccgagycgcg | ctcgccctct | gagctatttc | agaagtagtg | 7020 |
| aggaggcttt | tttgaggycg | taggcttttg | caaaaagctt | gattctcttg | acacaacagt | 7080 |
| ctcgaactta | aggttagagc | caccatgatt | gaacaagatg | gattgcacgc | aggttctccg | 7140 |
| gcccgttggg | tggagaggct | attcggctat | gactgggcac | aacagacaat | cggctgctct | 7200 |
| gatgcgcgcg | tgttcgggct | gtcagcgcag | gggcgcgcgc | ttctttttgt | caagaccgac | 7260 |
| ctgtccgggtg | ccctgaatga | actgcaggac | gaggcagcgc | ggctatcgtg | gctggccacg | 7320 |
| acgggcggtc | cttgccgcagc | tgtgctcgac | gttgtcactg | aagcgggaag | ggactggctg | 7380 |
| ctatttgggg | aagtgcgggg | gcaggatctc | ctgtcatctc | accttgctcc | tgcggagaaa | 7440 |
| gtatccatca | tggctgatgc | aatgcggcgg | ctgcatacgc | ttgatccggc | tacctgcccc | 7500 |
| ttcgaccaac | aagcgaaaaca | tgcctcgag | cgagcacgta | ctcggatgga | agccgggtctt | 7560 |
| gtcgatcagg | atgatctgga | cgaagagcat | caggggctcg | cgcacgcgga | actgttcgcc | 7620 |
| aggctcaagg | cgcgcagtcg | cgcgcgcgag | gatctcgtcg | tgacccatgg | cgatgcctgc | 7680 |
| ttgccgaata | tcatgggtgga | aaatggccgc | ttttctggat | tcatcgactg | tggccggctg | 7740 |
| ggtgtggcgg | accgctatca | ggacatagcg | ttggctaccc | gtgatattgc | tgaagagctt | 7800 |
| ggcggcggaat | gggctgacgg | cttctctctg | ctttacggta | tgcgcgctcc | cgattcgacg | 7860 |
| cgcctgcctt | tctatgcctt | tcttgacgag | ttctcttgag | cgggactctg | gggttcgaaa | 7920 |
| tgaccgacca | agcgaagccc | aacctgcgat | cacgatggcc | gcaataaaat | atctttattt | 7980 |
| tcattacatc | tgtgtgttgg | tttttttgtt | gaatcgatag | cgataaggat | ccgcgtatgg | 8040 |
| tgcactctca | gtacaatctg | ctctgatgcc | gcatagttaa | gccagccccg | acaccgcgca | 8100 |
| acaccgcgtg | acgcgccttg | acgggcttgt | ctgctcccg | catccgctta | cagacaagct | 8160 |

```

gtgaccgtct cggggagctg catgtgtcag aggtttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 8220
agacgaaagg gcttcgtgat acgctatatt ttataggtta atgtcatgat aataatgggt 8280
tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt 8340
ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa 8400
taatattgaa aaagggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt 8460
tttgcggcac tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat 8520
gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag 8580
atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg 8640
ctatgtggcg cgggtattatc ccgtattgac gcggggcaag agcaactcgg tcgccgcata 8700
cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 8760
ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtgataa cactgcggcc 8820
aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg 8880
ggggatcatg taactcgctt tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 8940
gagcagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact 9000
ggcgaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag actggatgga ggccgataaa 9060
gttgccaggac cacttctgct ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct 9120
ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc 9180
tcccgatatc tagttatcta caccgaggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 9240
cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac 9300
tcatatatac tttagattga tttaaaactt cattttttaa ttaaaaggat ctagggtgaag 9360
atcctttttg ataattctat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcggt cactgagcg 9420
tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaate 9480
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 9540
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 9600
cttctagtgat agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 9660
ctcgtctctg taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 9720
gggttggaact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt 9780
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 9840
gagctatgag aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 9900
ggcaggggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 9960
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca 10020
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt 10080
tgctggcctt ttgctcacat ggctcgacag atct 10114

```

<210> 19
 <211> 10384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY8.3G FB29(-)

<400> 19

ES 2 618 508 T3

```

agatccttgaa taataaaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
gactaaatcc atgtcgcgcg atagtgggtt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
aaattgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac 180
tgatategcc atttttccaa aagtgatatt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct 240
tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggtga cttgggcgat tctgtgtgtc 300
gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg 360
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc 420
attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480
tacgttggtat ccataatcgta atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc 540
atgttgacat tgattattga ctagtattta atagtaatca attacggggg cattagttca 600
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 660
gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 780
acatcaagtg tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 840
cgcctggcat tatgccagc acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta 900
cgtattagtc atcgctatta ccattggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg 960
atagcgggtt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 1020
gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc 1080
ccgttgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt 1140
ttagtgaacc gggcactcag attctgcggt ctgagtcctt tctctgctgg gctgaaaagg 1200

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cctttgtaat | aaatataatt | ctctactcag | tccttgtctc | tagtttgtct | gttcgagatc | 1260 |
| ctacagttgg | cgcccgaaac | gggacctgag | aggggcgcag | accctacctg | ttgaacctgg | 1320 |
| ctgatcgtag | gatccccggg | acagcagagg | agaacttaca | gaagtcttct | ggaggtgttc | 1380 |
| ctggccagaa | cacaggagga | caggtaagat | tgggagacct | tttgacattg | gagcaaggcg | 1440 |
| ctcaagaagt | tagagaaggt | gacgggtacaa | gggtctcaga | aattaaactac | tggttaactgt | 1500 |
| aattggggcgc | taagtctagt | agacttattt | catgatacca | actttgtaaa | agaaaaggac | 1560 |
| tggcagctga | gggatgtcat | tccattgctg | gaagatgtaa | ctcagacgct | gtcaggacaa | 1620 |
| gaaagagagg | cctttgaaag | aacatgggtg | gcaatttctg | ctgtaaagat | gggcctccag | 1680 |
| attaataatg | tagtagatgg | aaaggcatca | ttccagctcc | taagagcgaa | atatgaaaag | 1740 |
| aagactgtca | ataaaaagca | gtctgagccc | tctgaagaat | atctctagaa | ctagtggatc | 1800 |
| ccccgggctg | caggagtggg | gaggcacgat | cgcgctttg | gtcagggcgg | atccggccat | 1860 |
| tageccatatt | attcattggg | tatatagcat | aaatcaatat | tggctattgg | ccattgcata | 1920 |
| cgttgatctc | atatcataat | atgtacattt | atattggctc | atgtccaaca | ttaccggccat | 1980 |
| gttgacattg | attattgact | agttattaat | agtaatcaat | tacggggtea | ttagtccata | 2040 |
| gcccataatat | ggagttccgc | gttacataac | ttacggtaaa | tggcccgcc | ggctgacccg | 2100 |
| ccaacgaccc | cgccccattg | acgtcaataa | tgacgtatgt | tcccatagta | acgccaatag | 2160 |
| ggactttcca | ttgacgtcaa | tgggtggagt | attttacggta | aactgcccac | ttggcagtag | 2220 |
| atcaagtgtg | tcatatgcca | agtaagcccc | ctattgacgt | caatgacggg | aaatggcccc | 2280 |
| cctggcattta | tggccagtag | atgaccttat | gggactttcc | tacttggcag | tacatctacg | 2340 |
| tattagtcac | cgctattacc | atgggtgatgc | ggttttggca | gtacatcaat | gggctgggat | 2400 |
| agcggtttga | ctcacgggga | tttccaagtc | tccaccccat | tgacgtcaat | gggagtttgt | 2460 |
| tttggcacca | aaatcaacgg | gactttccaa | aatgtcgtaa | caactccggc | ccattgacgc | 2520 |
| aaatggggcgg | taggcattgt | cgggtgggag | tctatataag | cagagctcgt | ttagtgaacc | 2580 |
| gtcagatcgc | ctggagacgc | catccacgct | gttttgacct | ccatagaaga | caccggggacc | 2640 |
| gatccagcct | ccggcgcccc | aagcttggtg | ggatccaccc | gtcgccacca | tggtgagcaa | 2700 |
| ggggcgaggag | ctgttcaccc | gggtgggtgc | catcctgggt | gagctggacg | ggcagctaaa | 2760 |
| cgcccaacaag | ttcagcgtgt | ccggcgaggg | cgagggcgat | gccacctacg | gcaagctgac | 2820 |
| cctgaagttc | atctgcacca | ccggcaagct | gcccgtgccc | tggcccaccc | togtgaccac | 2880 |
| cctgacctac | ggcgtgcagt | gcttcagccg | ctaccccgac | cacatgaagc | agcacgactt | 2940 |
| cttcaagttc | gccatgcccc | aaggctacgt | ccaggagcgc | accatcttct | tcaaggacga | 3000 |
| cggcaactac | aagacccgcg | ccgaggtgaa | gttcgagggc | gacaccttgg | tgaacccgat | 3060 |
| cgagctgaag | ggctcgact | tcaaggagga | cggcaacatc | ctggggcaca | gtctggagta | 3120 |
| caactacaac | agccacaacg | tctatatcat | ggccgacaag | cagaagaacg | gcatcaaggt | 3180 |
| gaacttcaag | atccgccaca | acatcgagga | cggcagcgtg | cagctcgccg | accactacca | 3240 |
| gcagaacacc | ccatcgggcg | acggccccgt | gctgctgccc | gacaaccact | acctgagcac | 3300 |
| ccagtccgcc | ctgagcaaa | accccaacga | gaagcgcgat | cacatggtcc | tgctggagtt | 3360 |
| cgtgaccgcc | gcccggatca | ctctcggcac | ggacgagctg | tacaagtaaa | gcccgcgcga | 3420 |
| ctctagatgc | gacctgcagg | catgcaagct | tcaagtgtg | gagggggggc | ccggtaccca | 3480 |
| gcttttggtc | cttttagtga | gggttaattg | cgggggaagt | atttatcaat | aatcaagcac | 3540 |
| aagtaataca | tgagaaactt | ttactacagc | aagcacatc | ctccaaaaaa | ttttgttttt | 3600 |
| acaaaatccc | tgggtgaacat | gatttgaagg | gacctactag | ggtgctgtgg | aagggtgatg | 3660 |
| gtgcagtagt | agttaatgat | gaaggaaaag | gaataattgc | tgtaccatta | accaggacta | 3720 |
| agttactaat | aaaaccaa | tgagtattgt | tgcaggaagc | aagacccaac | taccattgtc | 3780 |
| agctgtgttt | cctgaacctc | atatttgtta | taaggtttga | tatgaatccc | agggggaatc | 3840 |
| tcaaccccta | ttacccaaca | gtcagaaaaa | tctaagtgtg | aggagaacac | aatgtttcaa | 3900 |
| ccttaattgtt | ataataatga | cagtaagaac | agcatggcag | aatcgaagga | agcaagagac | 3960 |
| caagaatgaa | cctgaaagaa | gaatctaag | aagaaaaaag | aagaaatgac | tgggtggaaaa | 4020 |
| taggtatgtt | tctgttatgc | ttagcaggaa | ctactggagg | aatactttgg | tggatatgaag | 4080 |
| gactcccaca | gcaacattat | ataggggttg | tggcgatagg | gggaagatta | aacggatctg | 4140 |
| gccaatcaaa | tgtatagaaa | tgttgggtt | ccttcccggg | gtgtagacca | tttcaaaaat | 4200 |
| acttcagtta | tgagaccaat | agaagcatgc | atatggataa | taatactgct | acattattag | 4260 |
| aagctttaac | caatataact | gctctataaa | taacaaaaca | gaattagaaa | catggaagtt | 4320 |
| agtaaagact | tctggcataa | ctcctttacc | tatttcttct | gaagctaaca | ctggactaat | 4380 |
| tagacataag | agagattttg | gtataagtg | aatagtggca | gctattgtag | ccgctactgc | 4440 |
| tattgtctgt | agcgtacta | tgtcttatgt | tgtcttaact | gaggttaaca | aaataatgga | 4500 |
| agtacaaaat | catacttttg | aggtagaaaa | tagtactcta | aatgggtatg | atttaataga | 4560 |
| acgacaaaata | aagatattat | atgctatgat | tcttcaaaaca | catgcagatg | ttcaactgtt | 4620 |
| aaaggaaaaga | caacaggtag | aggagacatt | taattttaatt | ggatgtatag | aaagaacaca | 4680 |
| tgtattttgt | catactgggt | atccctggaa | tatgtcatgg | ggacatttaa | atgagtcaac | 4740 |
| acaatgggag | gactgggtaa | gcaaaaatga | agattttaaat | caagagatac | taactacact | 4800 |
| tcattggagcc | aggaacaatt | tggcacaatc | catgataaca | ttcaatacac | cagatagtag | 4860 |
| agctcaattt | ggaaaagacc | tttggagtc | tattggaaat | tggattcctg | gattgggagc | 4920 |
| ttccattata | aaatatatag | tgatgttttt | gcttattttat | ttgttactaa | cctcttcgcc | 4980 |
| taagatcctc | agggccctct | ggaaggtagc | cagtggtgca | gggtcctccg | gcagtcgtta | 5040 |

```

cctgaagaaa aaattccate acaaacatgc atcgcgagaa gacacctggg accaggccca 5100
acacaacata cacctagcag gcgtgaccgg tggatcaggg gacaaatact acaagcagaa 5160
gtactccagg aacgactgga atggagaatc agaggagtac aacaggcggc caaagagctg 5220
ggtagaagtc atcgaggcat ttggagagag ctatatattcc gagaagacca aaggggagat 5280
ttctcagcct ggggcggcta tcaacgagca caagaacggc tctgggggga acaatcctca 5340
ccaagggtcc ttagacctgg agattcgaag cgaaggagga aacatttatg actgttgcac 5400
taaagcccaa gaaggaacte tgcctatccc ttgctgtgga tttcccttat ggctattttg 5460
gggactagta attatagtag gacgcatagc aggctatgga ttacgtggac tgcctgttat 5520
aataaggatt tgtattagag gcttaaattt gatatttgaa ataatcagaa aaatgcttga 5580
ttatattgga agagctttaa atcctggcac atctcatgta tcaatgcctc ttatatagat 5640
gaaaaacaag gggggaactg tggggttttt atgaggggtt ttataaatga ttataaagt 5700
aaaaagaaag ttgctgatgc tctcataacc ttgtataacc caaaggacta gctcatgttg 5760
ctaggcaact aaaccgcaat aaccgcattt gtgacgcgag ttcccccattg gtgacgcgtt 5820
aacttcctgt ttttacagta tataagtgc tgtattctga caattgggca ctcagattct 5880
gcggtctgag tcccttctct gctgggtgga aaaggccttt gtaataaata taattctcta 5940
ctcagtcctc gtctctagtt tgtctgttcg agatcctaca gagctcatgc cttggcgtaa 6000
tcatggttgc agctgttttc tgtgtgaaat tgtttatccc tcacaattcc acacaacata 6060
cgagccgga gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaag gactgagcta actcacatta 6120
attgcgttgc gctcactgcc cgttttccag tgggaaacc tgtcgtgcca gtgatgcccg 6180
ggcgccgag gcggcctacg tgaaccatca cccaaatcaa gttttttgag gtcgaggtgc 6240
cgtaaaagtc taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat tttagagcttg acggggaag 6300
ccgcgaaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggcgc tagggcgctg 6360
gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacacccg ccgcgcttaa tgcgcgccta 6420
cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgga tgcgtgcggg 6480
cctcttcgct attacgccag cccgtagcga tccctatcgg attttaccac attttagag 6540
gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacat ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat 6600
gcaattgttg ttgttaactt gtttatttga gcttataatg gttacaaata aagcaatagc 6660
atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg tttgtccaaa 6720
ctcatcaatg tatcttatca tgtctgctcg aagcattaac cctcactaaa gggaagcggc 6780
cgcccggttc gacttcacag gtgtttgagg cgtctttttg agtctccggg cctcaagacg 6840
cgggggttgc tctgctgcgc ccacagectt tctgtgccc tctggtagcc tcccctgccc 6900
gagaaatcgc cctctggtc ctcgcggaag tagagctccc tccagatgcc gcgattcacc 6960
tctcccagct ctttagcggc ttgttgcaag cccctaatte tccattccag cctttcttgg 7020
aggacctcgg cttgcaaaat ctggccctta atccacctat ccctcttgga ggggtgtgtg 7080
tgggtgggac cggggccgag gtgtctcttg gcgatgcagg tctggctagg aatctctctc 7140
tcgggcaggg actgtctcag caccgcggac cactggctcc cctccagggg gccttgtggg 7200
tcgatcttcc accagtcgtt gcggcgcttc tctcttttgc tctcttctct gaggttcac 7260
tcttgatccc tggcctcctt gctctcagcc atgggtggcg attctcaggg attcctccc 7320
gggtgtgggt cgggtgtccc tgggcagggg tctccagatc ccggacgagc ccccaaatga 7380
aagacccccc agacgggtag tcaatcactc tgaggagacc ctcccaagga acagcgagac 7440
cacgagtcgg atgcaacagc aagaggattt attggataca cgggtacccg ggcgactcag 7500
tctatcggag gactggcgcg ccgagtgagg ggttgtgagc tcttttatag agctcgggaa 7560
gcagaagcgc gcgaacagaa gcgagaagca ggttgatttg ttaattcaaa taaggcacag 7620
ggtcatttca ggtccttggg ggagcctgga aacatctgat gggctttaag aaactgctga 7680
gggttgggcc atatctggg accatctgtt ctggccccg ggcggggccc gaccgcagat 7740
gacctctgtt tcttggcccc gggcgggggc cgaaaactgt caccgcagat atcctgtttg 7800
gcccacggtt agctgttttc gtgtaccgac ccttgatctg aacttctcta ttcttgggtt 7860
ggtatttttc catgccttgc aaaatggcgt tactgcggct atcaggctaa gcaatttgag 7920
atctggccga ggcgccctac tctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgtt 7980
ttgcgtattg ggcgctcttc cgttccctcg ctcaactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 8040
ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg 8100
gataacgcag gaaagaacat gtataacttc gtataatgta tgctatacga agttatacat 8160
gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt 8220
ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcgaagtc agaggtggcg 8280
aaaccogaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tctgtcgcctc 8340
tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgac tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa 8400
ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtcgagctgc tgcgcttat ccgtaacta 8520
gctgggctgt gtgcacgaac ccccgcttca taagacaaga cttatcgcca ctggcagcag cacttggtaa 8580
tcgtcttagg tccaaccggg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 8640
ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt 8700
cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt 8760
ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaggga tctcaagaag atcctttgat 8820
cttttctacg gggctctgacg ctcagtgga cgttaaggga ttttggctat 8880

```


ES 2 618 508 T3

```

gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gtttttaaat 8940
aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagttaggc 9000
acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta 9060
gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga 9120
cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 9180
cagaagtggc cctgcaactt tatecgctc catccagttc attaatgtt gccgggaagc 9240
tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat 9300
cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag 9360
gcgagttaca tgatccccc tggtgtgcaa aaaagcgggt agtccttcg gtccctccg 9420
cgttgtcaga agtaagttag ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 9480
ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 9540
gtcattctga gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgcgccggcg caatacggga 9600
taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcacc attggaaaac gttcttcggg 9660
gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc 9720
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 9780
aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcatact 9840
cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatcacat 9900
atttgaaagt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc ccgaaaagt 9960
gccacctaaa ttgtaagcgt taatattttg ttaaaaattc cgttaaaatt ttgttaaate 10020
agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaaatc aaaagaatag 10080
accgagatag gggtgagtg tgttcagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg 10140
gactccaacg tcaaaggcg aaaaaccgtc tatcaggcg atggccact acgtgataac 10200
ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt 10260
tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaaggagcc ccgatttag 10320
agcttgacgg ggaaagccaa cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac 10380
cggc 10384

```

- 5 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia que flanquea la ORF de gag/pol de EIAV con codones optimizados
- <400> 20
 ttagagaat tcgccacat g 21
- 15 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Secuencia que flanquea la ORF de gag/pol de EIAV con codones optimizados
- 25 <400> 21
 tgaaccggg gcggccgc 18
- 30 <210> 22
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> pEV53B
- <400> 22
 caggtaagat g 11
- <210> 23
 <211> 42

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 23
 ggctagagaa ttccaggtaa gatgggcgat cccctcacct gg 42

 10
 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 24
 20 ttgggtactc ctgctaggt tc 22

 <210> 25
 <211> 4307
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de gag-pol con codones optimizados (pSYNGP)
 30
 <400> 25

 atggggcgccc ggcgcagcgt gctgtcgggc ggcgagctgg accgctggga gaagatccgc 60
 ctggcgcgccg ggcggcaaaaa gaagtacaag ctgaagcaca tcgtgtgggc cagccgcgaa 120
 ctggagcgcct tcgcggtgaa ccccgggctc ctggagacca gcgaggggtg ccgccagatc 180
 ctgggccaac tgcagcccag cctgcaaacc ggcagcgagg agctgcgcag cctgtacaac 240
 accgtggcca cgtgtactg cgtccaccag cgcatacgaaa tcaaggatac gaaagaggcc 300
 ctggataaaa tcaagagga acagaataag agcaaaaaaaggagcccaaca ggccgcgcgc 360
 gacaccggac acagcaacca ggtcagccag aactacccca tcgtgcagaa catccagggg 420
 cagatggtgc accaggccat ctccccccgc acgctgaacg cctgggtgaa ggtggtggaa 480
 gagaaggctt ttagcccgga ggtgataccc atgttctcag cctgtcaga gggagccacc 540
 cccaagatc tgaacaccat gctcaacaca gtggggggac accaggccgc catgcagatg 600
 ctgaaggaga ccatcaatga ggaggctgcc gaatgggatc gtgtgcatcc ggtgcacgca 660
 gggcccatcg caccgggcca gatgcgtgag ccacggggct cagacatcgc cggaacgact 720
 agtacccttc aggaacagat cggctggatg accaacaacc caccatccc ggtgggagaa 780
 atctacaaac gctggatcat cctgggcctg aacaagatcg tgcgcatgta tagccctacc 840
 agcatcctgg acatccgcca aggccgaag gaaccctttc gcgactacgt ggaccggttc 900
 tacaaaacgc tcgcgcgcca gcaggctagc caggaggtga agaactggat gaccgaaacc 960
 ctgctggtcc agaacgcgaa cccggactgc aagacgatcc tgaaggccct gggccagcg 1020
 gctaccctag aggaatgat gaccgcctgt caggaggtgg gcggaccgg ccacaaggca 1080
 cggctcctgg ctgaggccat gagccagggtg accaactccg ctaccatcat gatgcagcgc 1140
 ggcaactttc ggaaccaacg caagatcgtc aagtgttca actgtggcaa agaaggcac 1200
 acagcccgca actgcagggc ccctaggaaa aagggtgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
 caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320
 cacaaggga ggccaggga ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380
 gagagcttca ggtttgggga agagacaaca actccctctc agaagcagga gccgatagac 1440
 aaggaactgt atccttttagc ttccctcaga tcaactttt gcagcgacc ctcgtcaca 1500
 taaagatagg ggggcagctc aaggaggctc tcctggacac cggagcagac gacaccgtgc 1560
 tggaggagat gtcgttgcca ggccgctgga agccgaagat gatcggggga atcggcggtt 1620
 tcatcaagggt gcgccagtat gaccagatcc tcatcgaaat ctgcggccac aaggctatcg 1680
 gtaccgtgct ggtgggcccc acaccgtca acatcatcgg acgcaacctg ttgacgcaga 1740
 tcgggtgcac gctgaacttc cccattagcc ctatcgagac ggtaccggtg aagctgaagc 1800
 ccgggatgga cggcccggaag gtcaagcaat ggccattgac agaggagaag atcaaggcac 1860

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| tggtggagat | ttgcacagag | atggaaaagg | aagggaaaat | ctccaagatt | gggcctgaga | 1920 |
| acccgtacaa | cacgcgggtg | ttcgcaatca | agaagaagga | ctcgacgaaa | tggcgcaagc | 1980 |
| tggtggactt | cgcgagctg | aacaagcgca | cgcaagactt | ctgggagggt | cagctgggca | 2040 |
| tcccgcaccc | cgcagggctg | aagaagaaga | aatccgtgac | cgtactggat | gtgggtgatg | 2100 |
| cctactttct | cgttccccctg | gacgaagact | tcaggaagta | caactgcctt | acaatocctt | 2160 |
| cgatcaacaa | cgagacaccg | gggattcgat | atcagtaaaa | cgtgctgccc | cagggctgga | 2220 |
| aaggctctcc | cgcaatcttc | cagagtagca | tgacaaaaat | cctggagcct | ttccgcaaac | 2280 |
| agaadccccg | catcgtcatc | tatcagtaca | tggatgactt | gtacgtgggc | tctgatctag | 2340 |
| agatagggca | gcaccgcacc | aagatcgagg | agctgcgcca | gcacctgttg | aggtggggac | 2400 |
| tgaccacacc | cgacaagaag | caccagaagg | agcctccctt | cctctgggat | ggttacgagc | 2460 |
| tgcacctga | caaatggacc | gtgcagccta | tcgtgctgcc | agagaaagac | agctggactg | 2520 |
| tcaacgacat | acagaagctg | gtggggaagt | tgaactgggc | cagtcagatt | taccagggga | 2580 |
| ttaagggtgag | gcagctgtgc | aaactcctcc | gcggaaccaa | ggcactcaca | gaggtgatcc | 2640 |
| ccctaaccga | ggaggccgag | ctcgaactgg | cagaaaaccg | agagatccta | aaggagcccg | 2700 |
| tgcacggcgt | gtactatgac | ccctccaagg | acctgatcgc | cgagatccag | aagcaggggc | 2760 |
| aaggccagtg | gacctatcag | atttaccagg | agcccttcaa | gaacctgaag | accggcaagt | 2820 |
| acgcccggat | gaggggtgcc | cacactaacg | acgtcaagca | gctgaccgag | gccgtgcaga | 2880 |
| agatcaccac | cgaaagcatc | gtgatctggg | gaaagactcc | taagttcaag | ctgcccattcc | 2940 |
| agaaggaaaac | ctgggaaaacc | tggtggacag | agtattggca | ggccacctgg | attcctgagt | 3000 |
| gggagttcgt | caacaccctt | cccttggtga | agctgtggta | ccagctggag | aaggagccca | 3060 |
| tagtgggcgc | cgaaaccttc | tacgtggatg | gggcccgtaa | cagggagact | catgtgggca | 3120 |
| aagccggata | cgtcactaac | cggggcagac | agaaggttgt | cacctcact | gacaccacca | 3180 |
| accagaagac | tgagctgcag | gccatttacc | tcgctttgca | ggactcgggc | ctggaggtga | 3240 |
| acatcgtgac | agactctcag | tatgccctgg | gcatacttca | agcccagcca | gaccagagtg | 3300 |
| agtccgagct | ggtcaatcag | atcatcgagc | agctgatcaa | gaaggaaaag | gtctatctgg | 3360 |
| cctgggtacc | cgccacacaa | ggcattggcg | gcaatgagca | ggtcgacaag | ctgggtctcgg | 3420 |
| ctggcatcag | gaagggtgcta | ttcctgggat | gcacgcacaa | ggcccaggac | gagcacgaga | 3480 |
| aataccacag | caactggcgg | gccatggcta | gcgacttcaa | cctgccccct | gtgggtggcca | 3540 |
| aagagatcgt | ggccagctgt | gacaagtgtc | agctcaaggg | cgaagccatg | catggccagg | 3600 |
| tggactgtag | cccggcctc | tggcaactcg | attgcaccca | tctggagggc | aaggttatcc | 3660 |
| tggtagccgt | ccatgtggcc | agtggctaca | tcgaggccga | ggtcattccc | gocgaaacag | 3720 |
| ggcaggagac | agcctacttc | ctcctgaagc | tggcaggccg | gtggccagtg | aagaccatcc | 3780 |
| atactgacaa | tggcagcaat | ttcaccagtg | ctacggttaa | ggccgcctgc | tggtgggcgg | 3840 |
| gaatcaagca | ggagttcggg | atccccctaca | atccccagag | tcagggcgte | gtcgagtcta | 3900 |
| tgaataagga | gttaaagaag | attatcggcc | aggtcagaga | tcaggctgag | catctcaaga | 3960 |
| ccgcggtcca | aatggcggta | ttcatccaca | atttcaagcg | gaaggggggg | attgggggggt | 4020 |
| acagtgcggg | ggagcggatc | gtggacatca | tcgcgaccga | catccagact | aaggagctgc | 4080 |
| aaaagcagat | taccaagatt | cagaatttcc | gggtctacta | cagggacagc | agaaatcccc | 4140 |
| tctggaaagg | cccagcgaag | ctcctctgga | aggggtgagg | ggcagtagtg | atccaggata | 4200 |
| atagcgacat | caagggtggtg | cccagaagaa | aggcgaagat | cattagggat | tatggcaaac | 4260 |
| agatggcggg | tgatgattgc | gtggcgagca | gacaggatga | ggattag | | 4307 |

<210> 26
 <211> 4307
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pGP-RRE3

<400> 26

ES 2 618 508 T3

```

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60
ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaacata tagtatgggc aagcagggag 120
ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata 180
ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240
acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caagggaagct 300
ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg 420
caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtagtagaa 480
gagaaggctt tcagccacaga agtgataccc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtgggggggac atcaagcagc catgcaaatg 600
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcaccc agtgcacgca 660
gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact 720

```

```

agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acaataaata cacctatccc agtaggagaa 780
atttataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta tagccctacc 840
agcattcttg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccgggtc 900
tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960
ttgtttggtc aaaatgcgaa ccagagattgt aagactatgt taaaagcatt gggaccagcg 1020
gctacactag aagaaatgat gacagcatgt caggagtag gaggaccggg ccataaggca 1080
agagttttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaatccag ctaccataat gatgcagaga 1140
ggcaatttta ggaaccaag aagattggtt aagtgtttca attgtggcaa agaaggcac 1200
acagccagaa attgcagggc ccctaggaaa aagggtgtgt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320
tacaaggga gggcaggga ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380
gagagcttca ggtctgggt agagacaaca actcccctc agaagcagga gccgatagac 1440
aaggaactgt atcctttaac ttccctcaga tctctcttg gcaacgaccc ctctgcacaa 1500
taaagatagg ggggcaacta aaggaagctc tattagatac aggagcagat gatacagtat 1560
tagaagaaat gagtttgcca ggaagatgga aacaaaaaat gataggggga attggagggt 1620
ttatcaaagt aagacagtat gatcagatac ctatagaaat ctgtggacat aaagctatag 1680
gtacagtatt agtaggacct acacctgtca acataattgg aagaaatctg ttgactcaga 1740
ttggttgcac tttaaatttt ccctattagc ctattgagac tgtaccagta aaattaaagc 1800
caggaatgga tggcccaaaa gttaaaacat ggccattgac agaagaaaaa ataaaagcat 1860
tagtagaaat ttgtacagag atggaaaagg aagggaaaaa ttcaaaaatt gggcctgaaa 1920
atccatacaa tactccagta tttgccataa agaaaaaaga cagtactaaa tggagaaaat 1980
tagtagatgt cagagaactt aataagagaa ctcaagactt ctgggaagtt caattaggaa 2040
taccacatcc cgcagggtta aaaaagaaaa aatcagtaac agtactggat gtgggtgatg 2100
catatttttc agttccctta gatgaagact tcaggaaata tactgcattt accataccta 2160
gtataaacia tgagacacca gggattagat atcagtacaa tgtgtctcca cagggatgga 2220
aaggatcacc agcaatattc caaagtagca tgacaaaaat cttagagcct tttagaaaac 2280
aaaatccaga catagtattc tatcaatata tggatgattt gtatgtagga tctgacttag 2340
aaatagggca gcatagaaca aaaatagagg agctgagaca acatctgttg aggtggggac 2400
ttaccacacc agacaaaaaa catcagaaag aacctccatt cctttggatg ggttatgaac 2460
tccatcctga taaatggaca gtacagccta tagtgctgcc agaaaaagac agctggactg 2520
tcaatgacat acagaagtta gtggggaat tgaattgggc aagtcagatt taccaggga 2580
ttaagtaag gcaattatgt aaactcctta gaggaaccaa agcactaaca gaagtaatac 2640
cactaacaga agaagcagag ctagaactgg cagaaaacag agagattcta aaagaaccag 2700
tacatggagt gtattatgac ccatcaaaag acttaatagc agaaatacag aagcaggggc 2760
aaggccaatg gacatatcaa atttatcaag agccatttaa aaatctgaaa acaggaaaat 2820
atgcaagaat gaggggtgcc cactactatg atgtaaaaca attaacagag gcagtgcaaa 2880
aaataaccac agaaagcata gtaatatggg gaaagactcc taaattttaa ctgcccatac 2940
aaaaggaaac atgggaaaca tgggtggacag agtattggca agccacctgg attcctgagt 3000
gggagtttgt taataccctc cctttagtga aattatggta ccagttagag aaagaaccac 3060
tagtaggagc agaaaccttc tatgtatagtg gggcagctaa caggagagact aaattaggaa 3120
aagcaggata tgttactaat agaggaagac aaaaagttgt caccctaact gacacaacaa 3180
atcagaagac tgagttacaa gcaatttata tagctttgca ggattcggga ttagaagtaa 3240
acatagtaac agactcacia tatgcattag gaatcattca agcacaacca gatcaaagt 3300
aatcagagtt agtcaatcaa ataataagag agttaataaa aaaggaaaag gtctatctgg 3360
catgggtacc agcacacaaa ggaattggag gaaatgaaca agtagataaa ttagtcagt 3420
ctggaatcag gaaagtacta ttttttagatg gaatagataa ggccaagat gaacatgaga 3480
aatatcacag taattggaga gcaatggcta gtgattttaa cctgccacct gtagtagcaa 3540
aagaaatagt agccagctgt gataaatgtc agctaaaagg agaagccatg catggacaag 3600
tagactgtag tccaggaata tggcaactag attgtacaca tttagaagga aaagttatcc 3660
tggttagcagt tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agttattcca gcagaaacag 3720
ggcaggaaac agcatatttt cttttaaaat tagcaggaag atggccagta aaacaatac 3780
atacagacaa tggcagcaat ttccaccagt ctacggttaa ggccgcctgt tgggtggcgg 3840
gaatcaagca ggaatttgga attccctaca atcccaaag tcaaggagta gtagaatcta 3900
tgaataaaga attaaagaaa attataggac aggtaaagaa tcaggctgaa catcttaaga 3960
cagcagtaca aatggcagta ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg 4020
acagtgcagg ggaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaaact aaagaattac 4080
aaaaacaaat tacaaaaatt caaaattttc ggggtttatta cagggacagc agaaatccac 4140
tttggaaagg accagcaaag ctccctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata 4200
atagtgcacat aaaagtagtg ccaagaagaa aagcaaagat cattagggat tatggaaaac 4260
agatggcagg tgatgattgt gtggcaagta gacaggatga ggattag 4307

```

<210> 27
 <211> 4658
 <212> ADN
 <213> Virus de la anemia infecciosa equina

<400> 27

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atggggagacc | cttttgacatg | gagcaaggcg | ctcaagaagt | tagagaaggt | gacgggtacaa | 60 |
| gggtctcaga | aatttaactac | tggttaactgt | aatttgggcgc | taagtctagt | agacttatttt | 120 |
| catgatacca | acttttgtaaa | agaaaaggac | tggcagctga | gggatgtcat | tccatttgctg | 180 |
| gaagatgtaa | ctcagacgct | gtcaggacaa | gaaagagagg | cctttgaaag | aacatgggtgg | 240 |
| gcaatttctg | ctgtaaagat | gggcctccag | attaataatg | tagtagatgg | aaaggcatca | 300 |
| ttccagctcc | taagagcgaa | atatgaaaag | aagactgcta | ataaaaaagca | gtctgagccc | 360 |
| tctgaagaat | atccaatcat | gatagatggg | gctggaaaaca | gaaatttttag | acctctaaca | 420 |
| cctagaggat | atactacttg | ggtgaatacc | atacagacaa | atgggtctatt | aaatgaagct | 480 |
| agtcaaaaact | tatttgggat | attatcagta | gactgtactt | ctgaagaaat | gaatgcattt | 540 |
| ttggatgtgg | tacctggcca | ggcaggacaa | aagcagatat | tacttgatgc | aatttgataag | 600 |
| atagcagatg | attggggataa | tagacatcca | ttaccgaatg | ctccactggg | ggcaccacca | 660 |
| caagggccta | ttcccatgac | agcaagggtt | attagagggt | taggagtacc | tagagaaaaga | 720 |
| cagatggagc | ctgcttttga | tcagttttagg | cagacatata | gacaatggat | aatagaagcc | 780 |
| atgtcagaag | gcatcaaagt | gatgattgga | aaacctaaag | ctcaaaaatat | tagggcaagga | 840 |
| gctaagggaac | cttaccacaga | atttgttagac | agactattat | cccaaataaa | aagtgagggga | 900 |
| catccacaag | agattttcaaa | attcttgact | gatacactga | ctatttcagaa | cgcaaataag | 960 |
| gaatgtagaa | atgctatgag | acattttaaga | ccagaggata | cattagaaga | gaaaatgtat | 1020 |
| gcttgagag | acatttggaa | tacaaaacaa | aagatgatgt | tatttggcaaa | agcacttcag | 1080 |
| actgggtcttg | cgggcccat | taaagggtgga | gccttgaaag | gagggccact | aaaggcagca | 1140 |
| caaacatggt | ataactgtgg | gaagccagga | catttatcta | gtcaatgtag | agcacctaaa | 1200 |
| gtctgtttta | aatgtaaaaca | gcctggacat | ttctcaaagc | aatgcagaag | tgttccaaaa | 1260 |
| aacyggaagc | aaggggctca | agggaggccc | cagaaaacaa | ctttcccgat | acaacagaag | 1320 |
| agtcagcaca | acaaatctgt | tgtacaagag | actcctcaga | ctcaaaatct | gtaccacgat | 1380 |
| ctgagcgaaa | taaaaaagga | atacaatgtc | aaggagaagg | atcaagtaga | ggatctcaac | 1440 |
| ctggacagtt | tgtgggagta | acatataatc | tagagaaaag | gcctactaca | atagtattaa | 1500 |
| ttaatgatac | tcccttaaat | gtactgttag | acacaggagc | agatacttca | gtgttgacta | 1560 |
| ctgcacatta | taataggtta | aaatatagag | ggagaaaata | tcaagggacg | ggaataatag | 1620 |
| gagtgaggag | aaatgtggaa | acattttcta | cgctgtgac | tataaagaaa | aagggtagac | 1680 |
| acattaaagc | aagaatgcta | gtggcagata | ttccagtac | tattttggga | cgagatatct | 1740 |
| ttcaggactt | aggtgcaaaa | ttgggttttg | cacagctctc | caaggaaata | aaatttagaa | 1800 |
| aaatagagtt | aaaagagggc | acaatggggc | caaaaattcc | tcaatggcca | ctcactaagg | 1860 |
| agaaaactaga | agggggccaaa | gagatagtc | aaagactatt | gtcagaggga | aaaatatcag | 1920 |
| aagctagtga | caataatcct | tataattcac | ccatatttgt | aataaaaaag | aggtctggca | 1980 |
| aatggaggtt | attacaagat | ctgagagaat | taaacaaaac | agtacaagta | ggaacggaaa | 2040 |
| tatccagagg | attgcctcac | ccgggaggat | taattaaatg | taaacacatg | actgtattag | 2100 |
| atattggaga | tgcataatttc | actataccct | tagatccaga | gttttagacca | tatacagctt | 2160 |
| tcactattcc | ctccattaat | catcaagaac | cagataaaaag | atatgtgtgg | aaatgtttac | 2220 |
| cacaaggatt | cgtgttgagc | ccatataat | atcagaaaac | attacaggaa | atttttacaac | 2280 |
| cttttaggga | aagatatcct | gaagtacaat | tgtatcaata | tatggatgat | ttgttcatgg | 2340 |
| gaagtaatgg | ttctaaaaaa | caacacaaaag | agttaatcat | agaattaaag | gogatcttac | 2400 |
| tggaaaagg | ttttgagaca | ccagatgata | aattacaaga | agtgccacct | tatagctggc | 2460 |
| taggttatca | actttgtcct | gaaaatttga | aagtacaaaa | aatgcaatta | gacatggtaa | 2520 |
| agaatccaac | cottaatgat | gtgcaaaaat | taatggggaa | tataacatgg | atgagctcag | 2580 |
| ggatcccagg | gttgacagta | aaacacattg | cagctactac | taagggatgt | ttagagttga | 2640 |
| atcaaaaagt | aatttggacg | gaagaggcac | aaaaagagtt | agaagaaaat | aatgagaaga | 2700 |
| ttaaaaatgc | tcaaggggta | caatattata | atccagaaga | agaaatgtta | tgtgaggttg | 2760 |
| aaattacaaa | aaattatgag | gcaacttatg | ttataaaaca | atcacaagga | atcctatggg | 2820 |
| caggtaaaaa | gattatgaag | gctaataagg | gatgggtcaac | agtaaaaaat | ttaatgttat | 2880 |
| tgttgcaaca | tgtggcaaca | gaaagtatta | ctagagtagg | aaaatgtcca | acgttttaagg | 2940 |
| taccatttac | caaagagcaa | gtaatgtggg | aaatgcaaaa | aggatgggat | tattcttggc | 3000 |
| ttccagaaat | agtatataca | catcaagtag | ttcatgatga | ttggagaatg | aaatttggtag | 3060 |
| aagaacctac | atcaggaata | acaatataca | ctgatggggg | aaaacaaaat | ggagaaggaa | 3120 |
| tagcagctta | tgtgaccagt | aatgggagaa | ctaaacagaa | aagggttagga | cctgtcactc | 3180 |
| atcaagttgc | tgaagaatg | gcaatacaaa | tggcattaga | ggataccaga | gataaacaag | 3240 |
| taaatatagt | aactgatagt | tattatttgt | ggaaaaatat | tacagaagga | ttaggttttag | 3300 |
| aaggaccaca | aagtccttgg | tggcctataa | tacaaaatat | acgagaaaaa | gagatagttt | 3360 |
| attttgcttg | ggtacctggg | cacaaaagga | tatatggtaa | tcaattggca | aatgaagccg | 3420 |
| caaaaataaa | agaagaaatc | atgctagcat | accaaggcac | acaaatttaa | gagaaaagag | 3480 |
| atgaagatgc | agggtttgac | ttatgtgttc | cttatgacat | catgatacct | gtatctgaca | 3540 |
| caaaaatcat | accacagat | gtaaaaattc | aagttccctc | taatagcttt | ggatgggtca | 3600 |

```

ctgggaaatc atcaatggca aaacaggggt tattaattaa tggaggaata attgatgaag 3660
gatatacagg agaaatataa gtgatatgta ctaatatagg aaaaagtaat attaaattaa 3720
tagagggaca aaaatttgca caattaatta tactacagca tcaactcaa tccagacagc 3780
cttgggatga aaataaaata tctcagagag gggataaagg atttggaagt acaggagtat 3840
tctgggtaga aaatattcag gaagcacaag atgaacatga gaattggcat acatcaccaa 3900
agatattggc aagaaattat aagataccat tgactgtagc aaaacagata actcaagaat 3960
gtcctcattg cactaagcaa ggatcaggac ctgcagggtg tgtcatgaga tctcctaatac 4020
attggcaggc agattgcaca catttgagca ataagataat attgactttt gtagagtcaa 4080
attcaggata catacatgct acattattgt caaaagaaaa tgcattatgt acttcattgg 4140
ctattttaga atgggcaaga ttgttttcac caaagtcctt acacacagat aacggcacta 4200
atthttgtggc agaaccagtt gtaaatttgt tgaagttcct aaagatagca cataccacag 4260
gaataccata tcatccagaa agtcagggtt ttgtagaaag ggcaaatagg accttgaaag 4320
agaagattca aagtcataga gacaacactc aaacactgga ggcagcttta caacttgctc 4380
tcattacttg taacaaaggg agggaaagta tgggaggaca gacaccatgg gaagtattta 4440
tcactaatca agcacaagta atacatgaga aacttttact acagcaagca caatcctcca 4500
aaaaattttg tttttacaaa atccttggtg aacatgattg gaagggaact actagggtgc 4560
tgtggaaggg tgatggtgca gtagtagtta atgatgaagg aaagggaata attgctgtac 4620
cattaaccag gactaagtta ctaataaaac caaattga 4658

```

<210> 28
 <211> 385
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY3.1

<400> 28

```

atgggagacc ctttgacatg gagcaaggcg ctcaagaagt tagagaagggt gacgggtacaa 60
gggtctcaga aattaactac tggtaactgt aattgggccc taagtctagt agacttattt 120
catgatacca actttgtaaa agaaaaggac tggcagctga gggatgtcat tccattgctg 180
gaagatgtaa ctcagacgct gtcaggacaa gaaagagagg cctttgaaag aacatgggtg 240
gcaatttctg ctgtaaagat gggcctccag attaataatg tagtagatgg aaaggcatca 300
ttccagctcc taagagcgaa atatgaaaag aagactgcta ataaaaagca gtctgagccc 360
tctgaagaat atccaatcat gatag 385

```

<210> 29
 <211> 385
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pONY3.2opti

<400> 29

```

atgggagatc ccttcacctg gtccaaagcc ctgaaaaaac tggaaaaagt caccgttcag 60
ggtagccaaa agcttaccac aggcaattgc aactgggcat tgtccctggg ggatcttttc 120
cacgacacta atttcgttaa ggagaaagat tggcaactca gagacgtgat cccctctttg 180
gaggacgtga cccaaacatt gtctgggcag gagcgcgaa ctttcgagcg caccgtggtg 240
gccatcagcg cagtcaaaat ggggctgcaa atcaacaacg tggttgacgg taaagctagc 300
tttcaactgc tccgcgctaa gtacgagaaa aaaaccgcca acaagaaaca atccgaacct 360
agcgaggagt acccaatcat gatag 385

```

<210> 30
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia humana

<400> 30
 atgggtgcga ga 12

5
 <210> 31
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

10
 <400> 31
 gatgaggatt ag 12

15
 <210> 32
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> gagpol-SYNgp

25
 <400> 32
 atgggcgccc gc 12

30
 <210> 33
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> gagpol-SYNgp

40
 <400> 33
 gatgaggatt ag 12

45
 <210> 34
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

50
 <400> 34
 atgagagtga ag 12

55
 <210> 35
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

60
 <400> 35
 gctttgctat aa 12

65
 <210> 36
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> synGP160mn

75
 <400> 36
 atgagggtga ag 12

80
 <210> 37
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> synGP160mn

5 <400> 37
gcgctgctgt aa 12

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un vector de VIH de replicación defectuosa, que comprende transfectar una célula productora con lo siguiente:
 - i) un genoma del VIH que comprende un nucleótido de interés (NOI), una señal de empaquetamiento y RRE;
 - ii) una secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH; y
 - iii) una secuencia nucleotídica que codifica una proteína env;
- caracterizado por que la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH está optimizada en sus codones para la expresión en la célula productora, a excepción de la secuencia que engloba el sitio de desplazamiento de fase de lectura, y en el que (ii) no comprende RRE; en el que la célula productora expresa *rev* y en el que el vector de VIH es un vector de autoinactivación.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia nucleotídica con codones optimizados tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15.
3. Una célula productora de partículas de vector de VIH que comprende:
 - i) un genoma del VIH que comprende al menos una secuencia nucleotídica de interés, señal de empaquetamiento y RRE; y
 - ii) una secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH; y
 - iii) una secuencia nucleotídica que codifica una proteína env;
- caracterizada por que la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol del VIH está optimizada en sus codones para la expresión en la célula productora, a excepción de la secuencia que engloba el sitio de desplazamiento de fase de lectura, y en la que (ii) no comprende RRE; en la que la célula productora expresa *rev* y en la que el vector de VIH es un vector de autoinactivación.
4. Una célula productora de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la secuencia nucleotídica con codones optimizados tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15.
5. Una célula productora de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el gen de la envoltura está optimizado en sus codones.
6. Una célula productora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que el nucleótido de interés se selecciona entre un gen terapéutico, un gen marcador y un gen de selección.
7. Una célula productora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para su uso en un método de producción de partículas de vector del VIH.
8. Una composición farmacéutica que comprende la célula productora de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

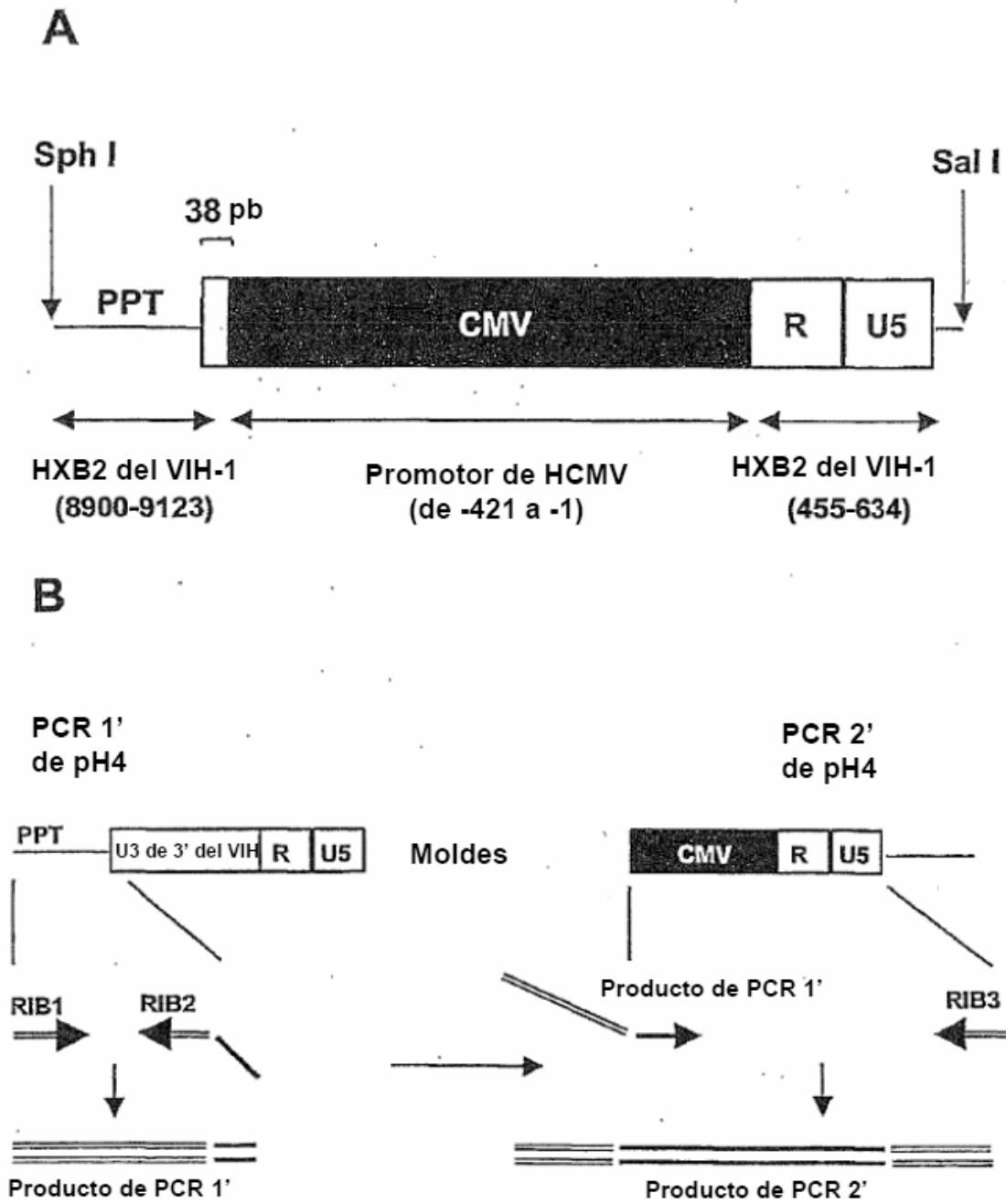


FIGURA 2

gagpol-HXB2 -> Uso de los codones

Secuencia de ADN 4308 pb ATGGGTGCGAGA ... GATGAGGATTAG lineal

1436 codones

PM : 161929 Dalton CAI(S.c.) : 0.083 CAI(E.c.) : 0.151

| | | | | | | | |
|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|
| TTT phe F | 21 | TCT ser S | 3 | TAT tyr Y | 30 | TGT cys C | 18 |
| TTC phe F | 14 | TCC ser S | 3 | TAC tyr Y | 9 | TGC cys C | 2 |
| TTA leu L | 46 | TCA ser S | 19 | TAA OCH Z | - | TGA OPA Z | - |
| TTG leu L | 11 | TCG ser S | 1 | TAG AMB Z | 1 | TGG trp W | 37 |
| CTT leu L | 13 | CCT pro P | 21 | CAT his H | 20 | CGT arg R | - |
| CTC leu L | 7 | CCC pro P | 14 | CAC his H | 7 | CGC arg R | - |
| CTA leu L | 17 | CCA pro P | 41 | CAA gln Q | 56 | CGA arg R | 3 |
| CTG leu L | 16 | CCG pro P | - | CAG gln Q | 39 | CGG arg R | 3 |
| ATT ile I | 30 | ACT thr T | 24 | AAT asn N | 42 | AGT ser S | 18 |
| ATC ile I | 14 | ACC thr T | 20 | AAC asn N | 16 | AGC ser S | 16 |
| ATA ile I | 56 | ACA thr T | 43 | AAA lys K | 88 | AGA arg R | 45 |
| ATG met M | 29 | ACG thr T | 1 | AAG lys K | 34 | AGG arg R | 18 |
| GTT val V | 15 | GCT ala A | 17 | GAT asp D | 37 | GGT gly G | 11 |
| GTC val V | 11 | GCC ala A | 19 | GAC asp D | 26 | GGC gly G | 10 |
| GTA val V | 55 | GCA ala A | 55 | GAA glu E | 75 | GGA gly G | 61 |
| GTG val V | 15 | GCG ala A | 5 | GAG glu E | 32 | GGG gly G | 26 |

FIGURA 3a

gagpol-SYNgp [1 a 4308] -> Uso de los codones

Secuencia de ADN 4308 pb ATGGGCGCCCGC ... GATGAGGATTAG lineal

1436 codones

PM : 161929 Dalton CAI(S.c.) : 0.080 CAI(E.c.) : 0.296

| | | | | | | | |
|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|
| TTT phe F | 5 | TCT ser S | 5 | TAT tyr Y | 10 | TGT cys C | 6 |
| TTC phe F | 30 | TCC ser S | 11 | TAC tyr Y | 29 | TGC cys C | 14 |
| TTA leu L | 2 | TCA ser S | 4 | TAA OCH Z | - | TGA OPA Z | - |
| TTG leu L | 7 | TCG ser S | 6 | TAG AMB Z | 1 | TGG trp W | 37 |
| CTT leu L | 3 | CCT pro P | 14 | CAT his H | 6 | CGT arg R | 2 |
| CTC leu L | 22 | CCC pro P | 39 | CAC his H | 21 | CGC arg R | 34 |
| CTA leu L | 6 | CCA pro P | 10 | CAA gln Q | 14 | CGA arg R | 3 |
| CTG leu L | 70 | CCG pro P | 13 | CAG gln Q | 81 | CGG arg R | 10 |
| ATT ile I | 17 | ACT thr T | 11 | AAT asn N | 13 | AGT ser S | 7 |
| ATC ile I | 79 | ACC thr T | 48 | AAC asn N | 45 | AGC ser S | 27 |
| ATA ile I | 4 | ACA thr T | 13 | AAA lys K | 25 | AGA arg R | 7 |
| ATG met M | 29 | ACG thr T | 16 | AAG lys K | 97 | AGG arg R | 13 |
| GTT val V | 5 | GCT ala A | 15 | GAT asp D | 19 | GGT gly G | 10 |
| GTC val V | 27 | GCC ala A | 56 | GAC asp D | 44 | GGC gly G | 54 |
| GTA val V | 6 | GCA ala A | 13 | GAA glu E | 29 | GGA gly G | 16 |
| GTG val V | 58 | GCG ala A | 12 | GAG glu E | 78 | GGG gly G | 28 |

Uso de los codones en genes humanos (MH), Gag-pol del VIH-1 de tipo silvestre (WT) y Gag-pol del VIH-1 con codones optimizados (CO)

| | | MH | WT | CO | | | MH | WT | CO | | | MH | WT | CO | | | MH | WT | CO |
|------------|---|----|----|----|------------|---|----|----|----|------------|---|----|----|----|------------|---|----|----|----|
| Ala | A | 13 | 46 | 8 | Cys | C | 68 | 10 | 70 | Leu | A | 3 | 14 | 3 | Ser | C | 34 | 35 | 55 |
| GC | C | 53 | 19 | 65 | TG | T | 32 | 90 | 30 | CT | C | 26 | 8 | 17 | AG | T | 10 | 10 | 3 |
| | G | 17 | 11 | 8 | | | | | | | G | 58 | 14 | 70 | TC | A | 5 | 38 | 17 |
| | T | 17 | 24 | 19 | Gln | A | 12 | 53 | 21 | | T | 5 | 11 | 6 | | C | 28 | 10 | 14 |
| | | | | | CA | G | 88 | 47 | 79 | TT | A | 2 | 42 | 6 | | G | 9 | 3 | 7 |
| | | | | | | | | | | | G | 6 | 11 | 0 | | T | 13 | 3 | 3 |
| Arg | A | 10 | 58 | 10 | Glu | A | 25 | 65 | 38 | Lys | A | 18 | 58 | 28 | Thr | A | 14 | 45 | 18 |
| AG | G | 18 | 29 | 11 | GA | G | 75 | 35 | 62 | AA | G | 82 | 42 | 72 | AC | C | 57 | 29 | 52 |
| CG | A | 6 | 6 | 0 | | | | | | Phe | C | 80 | 45 | 45 | | G | 15 | 0 | 19 |
| | C | 37 | 0 | 61 | Gly | A | 14 | 53 | 21 | TT | T | 20 | 55 | 55 | | T | 14 | 26 | 13 |
| | G | 21 | 6 | 10 | GG | C | 50 | 21 | 55 | | | | | | Tyr | C | 74 | 20 | 80 |
| | T | 7 | 0 | 5 | | G | 24 | 24 | 24 | Pro | A | 16 | 52 | 24 | TA | T | 26 | 80 | 20 |
| Asn | C | 78 | 29 | 71 | | T | 12 | 3 | 0 | CC | C | 48 | 15 | 39 | | | | | |
| AA | T | 22 | 71 | 29 | His | C | 79 | 30 | 90 | | G | 17 | 3 | 21 | Val | A | 5 | 56 | 4 |
| | | | | | CA | T | 21 | 70 | 10 | | T | 19 | 30 | 15 | GT | C | 25 | 8 | 20 |
| Asp | C | 75 | 64 | 70 | | | | | | | | | | | | G | 64 | 24 | 76 |
| GA | T | 25 | 36 | 30 | Ile | A | 5 | 58 | 8 | | | | | | | T | 7 | 12 | 0 |
| | | | | | AT | C | 18 | 19 | 92 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | T | 77 | 23 | 0 | | | | | | | | | | |

FIGURA 3b

FIGURA 4

env-mn [1 a 2571] -> Uso de los codones

Secuencia de ADN 2571 pb ATGAGAGTGAAG ... GCTTTGCTATAA lineal

857 codones

PM : 97078 Dalton CAI(S.c.) : 0,083 CAI(E.c.) : 0,140

| | | | | | | | |
|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|
| TTT phe F | 13 | TCT ser S | 7 | TAT tyr Y | 15 | TGT cys C | 16 |
| TTC phe F | 11 | TCC ser S | 3 | TAC tyr Y | 7 | TGC cys C | 5 |
| TTA leu L | 20 | TCA ser S | 13 | TAA OCH Z | 1 | TGA OPA Z | - |
| TTG leu L | 17 | TCG ser S | 2 | TAG AMB Z | - | TGG trp W | 30 |
| CTT leu L | 9 | CCT pro P | 5 | CAT his H | 8 | CGT arg R | - |
| CTC leu L | 11 | CCC pro P | 9 | CAC his H | 6 | CGC arg R | 2 |
| CTA leu L | 12 | CCA pro P | 12 | CAA gln Q | 22 | CGA arg R | 1 |
| CTG leu L | 15 | CCG pro P | 2 | CAG gln Q | 19 | CGG arg R | 1 |
| ATT ile I | 21 | ACT thr T | 16 | AAT asn N | 50 | AGT ser S | 18 |
| ATC ile I | 10 | ACC thr T | 14 | AAC asn N | 13 | AGC ser S | 11 |
| ATA ile I | 32 | ACA thr T | 28 | AAA lys K | 32 | AGA arg R | 30 |
| ATG met M | 17 | ACG thr T | 5 | AAG lys K | 14 | AGG arg R | 15 |
| GTT val V | 8 | GCT ala A | 16 | GAT asp D | 18 | GGT gly G | 10 |
| GTC val V | 9 | GCC ala A | 7 | GAC asp D | 14 | GGC gly G | 6 |
| GTA val V | 26 | GCA ala A | 20 | GAA glu E | 36 | GGA gly G | 28 |
| GTG val V | 12 | GCG ala A | 5 | GAG glu E | 10 | GGG gly G | 12 |

FIGURA 5

SYNgp160mn -> Uso de los codones

Secuencia de ADN 2571 pb ATGAGGGTGAAG ... GCGCTGCTGTAA lineal

857 codones

PM: 97078 Dalton CAI(S.c.) : 0,074 CAI(E.c.) : 0,419

| | | | | | | | |
|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|
| TTT phe F | - | TCT ser S | 2 | TAT tyr Y | 1 | TGT cys C | - |
| TTC phe F | 24 | TCC ser S | 4 | TAC tyr Y | 21 | TGC cys C | 21 |
| TTA leu L | - | TCA ser S | - | TAA och Z | 1 | TGA opa Z | - |
| TTG leu L | - | TCG ser S | - | TAG amb Z | - | TGG trp W | 30 |
| CTT leu L | - | CCT pro P | - | CAT his H | 2 | CGT arg R | 1 |
| CTC leu L | 20 | CCC pro P | 26 | CAC his H | 12 | CGC arg R | 36 |
| CTA leu L | 1 | CCA pro P | - | CAA gln Q | - | CGA arg R | - |
| CTG leu L | 63 | CCG pro P | 2 | CAG gln Q | 41 | CGG arg R | 4 |
| ATT ile I | 2 | ACT thr T | - | AAT asn N | 2 | AGT ser S | - |
| ATC ile I | 61 | ACC thr T | 59 | AAC asn N | 61 | AGC ser S | 48 |
| ATA ile I | - | ACA thr T | - | AAA lys K | 1 | AGA arg R | 2 |
| ATG met M | 17 | ACG thr T | 4 | AAG lys K | 45 | AGG arg R | 6 |
| GTT val V | - | GCT ala A | - | GAT asp D | 2 | GGT gly G | 1 |
| GTC val V | 1 | GCC ala A | 40 | GAC asp D | 30 | GGC gly G | 47 |
| GTA val V | 1 | GCA ala A | - | GAA glu E | 3 | GGA gly G | - |
| GTG val V | 53 | GCG ala A | 8 | GAG glu E | 43 | GGG gly G | 8 |

FIGURA 6
Construcciones de VIH

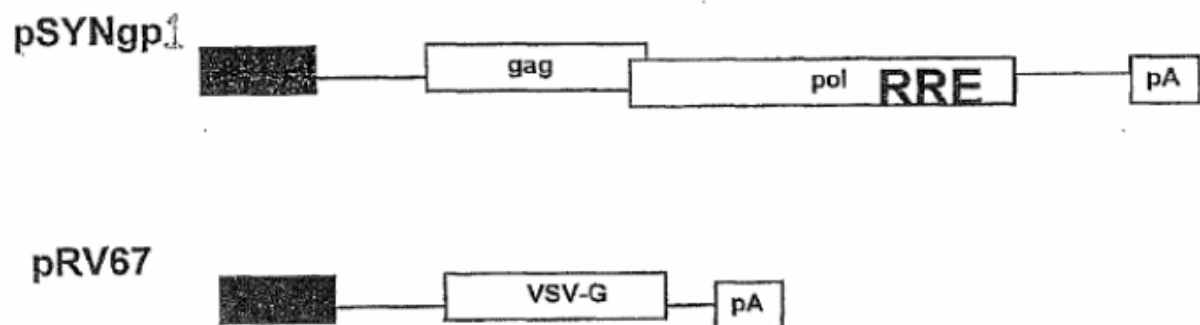
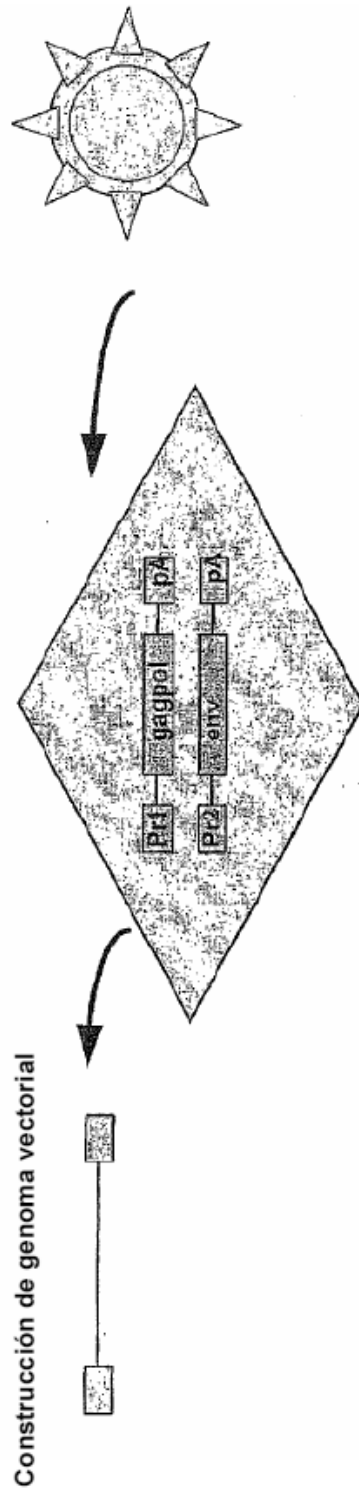


FIGURA 7

El sistema de vectores de Hit

Líneas celulares de empaquetamiento auxiliares



Cotransfección de tres plásmidos (HIT)

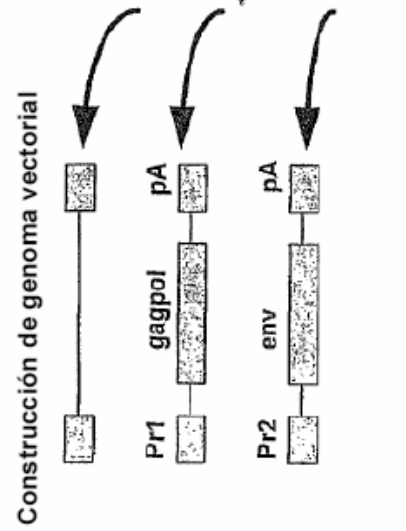


Figura 8

1 ATGGGCGCGGCGGCGAGCGTGTCTGCGGCGGCGAGCTGGACCGCTGGGA 50
 |||||
 1 ATGGTGCAGAGCGTCACTATTAAAGCGGGGAGAAATTAGATCGATGGGA 50
 |||||
 51 GAAGATCCGCTGTGCGCCCGGCGGCGAAGAAAGAAATACAGCTGAAGACA 100
 |||||
 51 AAAAATTCGTTAAGGCCAGGGGGAAGAAATATAAATTAATTAACATA 100
 |||||
 101 TCGTGTGGGCGCAGCGCGGAATGAGAGCGCTTGGCGGTGAACCCCGGCTC 150
 |||||
 101 TAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCGTTAATCTTGGCTG 150
 |||||
 151 CTGGAGACCGAGCGGGGTGCGCCAGATCCTCGGCGAAGCTGAGCGCAG 200
 |||||
 151 TTGAAACATCAGAAAGGCTGTGACAAATCTGGACAGCTACAAACATC 200
 |||||
 201 CCTGTGAAACCGGCAGCGAGGCTGCGCAGCCTGTGTAACAACCGTGGCCA 250
 |||||
 201 CCTTCAGACAGGATCAGAGAACTTAGATCATTTATATAATACGTAGCNA 250
 |||||
 251 CGCTGTACTCGTCCACCGACGCTCGAATCAAGGATACGAAGAGGCC 300
 |||||
 251 CCTCTATTGTGTGCTCAAGGATAGATTAAGACACCAAGGAAGCT 300
 |||||
 301 CTGGATAAATCCGAGAGGACAGATATAGGCGAAGAAAGAGGCCCAACA 350
 |||||
 301 TTAGACRAGATAGAGGAAGACCAACAAAGTTAGAAAGAACACAGCA 350
 |||||
 351 GCGCGCGGCGACACCGGACACAGCAACAGGTCAGCCAGAACTTACCCCA 400
 |||||
 351 AGCAGCGCTGACAGGACACAGCAATCAGGTCAGGCCAAATACCCCTA 400
 |||||
 401 TCGTGCAGAACTCCAGGGGCGAGTGTGTCACAGGCCATCTCCCGCGC 450
 |||||
 401 TAGTGCAGAACTCCAGGGGCGAATGGTACATCAGGCCATATCAOCTAGA 450
 |||||
 451 AGCTGAAACGCTGGGTGAGTGGTGGAGAGGAGGCTTTTACCGCGGA 500
 |||||
 451 ACTTTAAATGCTGGGTAAAGTAGTAGAGAGGAGGCTTTTACCGCGGA 500
 |||||
 501 GGTGATACCCATGTTCTCAGCCCTGTGAGAGGAGCCACCCCGAGATC 550
 |||||
 501 AGTGATACCCATGTTTTCAGCATTTATCAGAGGAGCCACCCCAAGATT 550
 |||||
 551 TGAACACCTGCTCAACACAGTGGGGGACACCGCGCGCATGCGATG 600
 |||||
 551 TAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATCAGCAGCCATGCAATG 600
 |||||

601 CTGAAGGAGACCATCAATGAGGAGGCTGCCGAATGGGATCGTGTGCAATCC 650
 |||||
 601 TTAAAGAGACCATCAATGAGGAGGCTGCCGAATGGGATAGATGCAATCC 650
 |||||
 651 GGTGACGACGAGGCGCCATCGCACCGGCCAGATCGTGTGAGCCACGCGGCT 700
 |||||
 651 AGTGATGAGGCGCTATTGCGACCGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAA 700
 |||||
 701 CAGCATGCGCGGACGATGATGACCCCTTCAGGAACAGATCGGCTGGATG 750
 |||||
 701 GTGACATGACGGAACCTACTAGTACCCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATG 750
 |||||
 751 ACCAACAACCCACCATCCGSGTGGGAGAAATCTACAAACGCTGGATCAT 800
 |||||
 751 ACMAATAATCCACCTATCCCGTAGGAGAAATTTATAAAGATGGATTAAT 800
 |||||
 801 CTTGGCCTGAAACAGATCGTGCATATATAGCCCTACACGATCTCTGG 850
 |||||
 801 CTTGGGTTAAATAAATAGTAAAGATGTATAGCCCTACACGATCTCTGG 850
 |||||
 851 ACATCCGCGAAGCCCGAGGAACCCCTTCGCGACTACGTGGAACGCTTC 900
 |||||
 851 ACATGACGAGGACCAAGAACCCCTTTAGAGCTATGTGACGCGTTC 900
 |||||
 901 TACAAACGCTCCGCGCAGCAGCTAGCCAGGAGGTGAGAACTGGAT 950
 |||||
 901 TATAAATCTCTAGAGCGAGCAGCTTCAAGGAGGTAAATAATGGAT 950
 |||||
 951 GACCGAACCCTGCTGTGTCAGAACGCGAACCCGACTGAGAGCAATCC 1000
 |||||
 951 GACGAAACCTTGTGTGTCGAAATGCGAATCCAGATTTGTAGACTATTT 1000
 |||||
 1001 TGAAGCCCTGGGCGCGAGCGCTACCTTAGAGGAATGATGACCGCTGT 1050
 |||||
 1001 TAAAGCATTTGGGACGAGCGCTACACTAGAAATATGATACAGCATGT 1050
 |||||
 1051 CAGGAGTGGCGGACCGCGCACAGGCGCGCTCTTGGCTGAGGCCAT 1100
 |||||
 1051 CAGGAGTGGAGGACCGCGCATAGGCGAGAGTGTGGCTGAGGCAAT 1100
 |||||
 1101 GAGCCAGGTGACCACTCCGCTACCATCATCATGATGCGCGCACTTTC 1150
 |||||
 1101 GAGCCAGGTGACCACTCCGCTACCATCATCATGATGCGAGAGGCAATTTTA 1150
 |||||
 1151 GGAACCAACGAGATCGTCAAGTGTCAACTGTGCGCAAGAGGCGAC 1200
 |||||
 1151 GGAACCAACGAGATGTTTGTAGTGTTCATTTGTGCGCAAGAGGCGAC 1200
 |||||

112

| | | | | | |
|------|---|------|------|--|------|
| 2401 | TGACACACCCGACAGAGAACACACAGAGAGGCGCTCCCTTCCTCTGGATG | 2450 | 3001 | GGGAGTTCTGTCTCAACACCCCTCCCTGGTGTAGAGCTGTGTGTCACGCTGGAG | 3050 |
| 2401 | TTACACACACTAGACAAAAAACAATCAGAAAGAACCTCCATCTCCTTTGGATG | 2450 | 3001 | GGGAGTTTGTTTAATAACCCCTCCTTTAGTGAATAATTATGGTACACAGTTAGAG | 3050 |
| 2451 | GGTTACGAGCTGACCCCTGACAAATGGACCGTGCAGCCTATCGTGTGCC | 2500 | 3051 | AAGAGGCCCATAGTGTGGCGGCGGAAAACCTTCTACGTGTGATGGGGCGCGCTAA | 3100 |
| 2451 | GGTTATGAACTCCATCCTCGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGTGCC | 2500 | 3051 | AAGAACCCCATATAGGAGCGAACAACCTTCTATGTAGATGGGGCGAGCTAA | 3100 |
| 2501 | AGAGAAAGACAGCTGGAGCTGTCAACGACATACAGAACTGTGTGGGAGAT | 2550 | 3101 | CAGGGAGACTTAAGCTGGGCAAGCCGGATAGCTTCACTAACCGGGGCGAGAC | 3150 |
| 2501 | AGAGAAAGACAGCTGGAGCTGTCAACGACATACAGAACTGTGTGGGAGAT | 2550 | 3101 | CAGGGAGACTTAAGTAAATAGGAAAGCAGGATATGTTACTAATAGAGGAAGAC | 3150 |
| 2551 | TGAACTGGGCGAGTTCAGATTTACCCAGGGATTAAGGTGAGGCGAGCTGTGC | 2600 | 3151 | AGRAGGTTGTTCACCCCTCAGCTGACACCCACACAGAGAGACTTGAGCTGCAG | 3200 |
| 2551 | TGAATTTGGGTAAAGTCAAGTTTACCCAGGGATTAAGGTGAGGCGAGCTGTGC | 2600 | 3151 | AAAAGTTTGTACCCCTTAACCTGACACACAACAAATCAGAGAGACTTGAGTTACAA | 3200 |
| 2601 | AAACTCCTCTGCGGAAACCAAGGCACTCAGAGGTGATCCCTTAACCGA | 2650 | 3201 | GCATTTTACCTCGCTTTCAGAGCTCGGGCTCGGAGCTGTGAACATCGTGAC | 3250 |
| 2601 | AAACTCCTTAGAGGAACCAAGGCACTCAGAGGTGATTAACCTTAACGAG | 2650 | 3201 | GCAATTTATCTAGCTTTGCGAGGATTCGGGATTTAGAAATTAACATAGTAAC | 3250 |
| 2651 | GGAGGCGGAGCTCGAACTGGCAGAAACCGAGAGATCTTAAGGAGCCCG | 2700 | 3251 | AGACTCTCAGTATGCTCGGGGAGTCAATTCAGCCCAACAGACCCAGAGTG | 3300 |
| 2651 | AGAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAACCGAGAGATCTTAAGGAGCCAG | 2700 | 3251 | AGACTCACAATATGCTTAGGAAATCATTCAGCACAACCCAGATCAAAAGTG | 3300 |
| 2701 | TGCACGGCTGTACTATGACCTCCAGAGCCTGTGTCGCGGATCCAG | 2750 | 3301 | AGTCCGAGCTGTGTCAATCAGATCATCGAGCAGCTGTATCAAGAGAGGAAG | 3350 |
| 2701 | TACATGGAGTGTATATGACCTCAAGACTTAATAGCAGAAATACAG | 2750 | 3301 | AATCAGAGTTTAGTCAATCAATAATATAGAGCAGTTAAATAAAGAGGAAG | 3350 |
| 2751 | AAGCAGGGCAGGCCAGTGGACCTATCAGATTTACAGAGGCTCTCAA | 2800 | 3351 | GTCTATCTGGCTGGGTACCGCCCAACAAGGCTGTGTGGGCAATGAGCA | 3400 |
| 2751 | AAGCAGGGCAGGGCAGGCAATGCAATTAATCAAGAGGCTCTCAA | 2800 | 3351 | GTCTATCTGGCATGGGTACCAAGCACAACAAAGAAATGGACAAATCAACA | 3400 |
| 2801 | GAACTTGAAACCGGCAGATGACCCCGGTGAGGGGTGCCACACTAAG | 2850 | 3401 | GGTCGACAGCTGTCTCTGGCTGGCATCAGGAAGGTGTATTCTCTGATG | 3450 |
| 2801 | AAATCTGAAACAGGAATAATGCAAGATGAGGGGTGCCACACTAAG | 2850 | 3401 | AGTAGATAAATTAGTGTGCTGTGATCAGGAAAGTACTATTATTAGATG | 3450 |
| 2851 | ACGTCAAGCAGCTGACCGAGGCGGTGCAGAGATCAACACCGAAGCATC | 2900 | 3451 | GCATCGACAGGGCCAGGACAGCAGAGAAATACCAAGCAACTGGCGG | 3500 |
| 2851 | ATGTAAACAAATTAACAGAGGCGGTGCAGAAATAACCAAGAGCATAT | 2900 | 3451 | GAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATGAGAAATATCAAGTAATTTGAGAGA | 3500 |
| 2901 | GTGATCTGGGGAAGACCTCCTAAGTTCAAGCTGCCCCATCCAGAGCAAC | 2950 | 3501 | GCCATGGCTAGCGACTTCAACCTGCCCTGTGTGGTGGCCCAAGAGATCGT | 3550 |
| 2901 | GTAAATGAGGGAAGACTCTTAATTTAAGTGTCCCATACAGAGGAAC | 2950 | 3501 | GCAATGGCTAGTGTATTTAACTGCCACCTGTGTAGCAAGAAATAGT | 3550 |
| 2951 | CTGGGAAACCTGTGTGACAGAGATTTGGCAGGCCACTGTGATTCCTGAGT | 3000 | 3551 | GGCCAGCTGTGACAGTGTCACTCAAGGCGAGCCATGTCATGGCCCGG | 3600 |
| 2951 | ATGGGAAACATGTGTGACAGAGATTTGGCAGGCCACTGTGATTCCTGAGT | 3000 | 3551 | AGCCAGCTGTGTGATAAATGTGACGTAAAGGAGAGCAATGTCATGGCAAG | 3600 |

3601 TGGACTGTAGCCCGGCACTCTGGCACAATCGATTGCACCCCATCTCTGGAGGCC 3650
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3601 TAGACTGTAGTCCAGGAATATGGCACTAGATTGTACACATTTTAGAAGGA 3650
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3651 AAGGTTATCCTGGTAGCCGTCACATGGCCAGTGCTACTCTCGAGGCCGA 3700
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3651 AAAGTTATCCTGGTAGCCGTTCACTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGA 3700
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3701 GGTCATTCCTCCGCCGAAACAGGGCAGGACAGCCCTACTCTCTCHTAAGC 3750
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3701 AGTTATTCAGCAGAAAACAGGGCAGGAAACAGCATATTTCTTTTAAAAAT 3750
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3751 TGGCAGGCGCGTGGCCAGTCAAGAACATCCATCTGACAAATGGCGAGCAAT 3800
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3751 TAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAATACTACACACATGGCGAGCAAT 3800
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3801 TTCCACCAGTCTACGGTTAAGCCGCTGCTGGTGGCGGGGAATCAAGCA 3850
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3801 TTCCACCAGTCTACGGTTAAGCCGCTGTTGGTGGCGGGGAATCAAGCA 3850
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3851 GAGGTTGGGATCCCCTACAAATCCCAGAGTCCGGGCGTCTGTGAGTCTA 3900
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3851 GGAATTTGGAAATTCCTACAAATCCCCAAGTCAAGAGTAGTCAATCTA 3900
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3901 TGAAATAAGGATTAAGAAATTAAGCAAGGTAAGAGATCAGGCTGAA 3950
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3951 CATCTCARGACCGCGTCCAAATGGCGGTATTCATCCACAAATTCRAAGCG 4000
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3951 CATCTTAAGCAGCAGTACAAATGGCGGTATTCATCCACAAATTTTAAAG 4000
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4001 GAAGGGGGGATTTGGGGGTACAGTCCGGGGGCGGATCGTGGACATCA 4050
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4001 AAAAGGGGGATTTGGGGGTACAGTCCGGGGGAGAAATAGTAGACATA 4050
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4051 TCGCACCGGCATCCAGACTAAGGAGCTGCAAPAGCAGATTACCAAGATT 4100
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4051 TAGCAACAGCATACAACTAAGGATTTACAAAPACAAATTTACAAATTT 4100
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4101 CAGAAATTCGGGTCTACTACAGGGGACAGCAAGATCCCTCTCGGAAGG 4150
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4101 CAATATTTGGGGTTTATTACAGGGGACAGCAAGATCCCTTTGGGAAGG 4150
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4151 CCCAGCGAGTCTCTCTGGAGGGTGGAGGGGCGAGTAGTGTCCAGGATA 4200
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4151 ACCAGCAAGTCTCTCTGGAGGGTGGAGGGGCGAGTAGTGTACAGGATA 4200
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

| | | |
|----|--|-----|
| WT | ATGGGAGACCCCTTTGACATGGAGCAAGGCGCTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAA | 60 |
| CO | ATGGGCGATCCCCCTCACCTGGTCCAAGCCCTGAAGAAACTGGAAAAAGTCACCGTTCAG | 60 |
| WT | GGGTCTCAGAAATTAACACTGTTAACTGTAATTTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTT | 120 |
| CO | GGTAGCCAAAAGCTTACCACAGGCAATTGCAACTGGGCATTGTCCCTGGTGGATCTTTTC | 120 |
| WT | CATGATACCAACTTTGTAAAAGAAAAGGACTGGCAGCTGAGGGATGTCATTCCATTGCTG | 180 |
| CO | CACGACACTAATTTTCGTAAAGGAGAAAGATTGGCAACTCAGAGACGTGATCCCCCTCTTG | 180 |
| WT | GAAGATGTAACCTCAGACGCTGTCTAGGACAAGAAAGAGAGGCCTTTGAAAGAACATGGTGG | 240 |
| CO | GAGGACGTGACCCAAACATTGTCTGGGCAGGAGCGCGAAGCTTTGAGCGCACCTGGTGG | 240 |
| WT | GCAATTTCTGCTGTAAAGATGGGCCTCCAGATTAAATAATGTAGTAGATGGAAAGGCATCA | 300 |
| CO | GCCATCAGCGCAGTCAAAATGGGGCTGCAATCAACAACGTGGTTGACGGTAAAGCTAGC | 300 |
| WT | TTCCAGCTCCTAAGAGCGAAATATGAAAAGAAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCC | 360 |
| CO | TTTCAACTGCTCCGCGCTAAGTACGAGAAGAAAACCGCCAACAAGAAACAATCCGAACCT | 360 |
| WT | TCTGAAGAATATCCAATCATGATAGATGGGGCTGGAAACAGAAATTTTAGACCTCTAACA | 420 |
| CO | AGCGAGGAGTACCCAATTATGATCGACGGCGCCGCAATAGGAACTTCCGCCCACTGACT | 420 |
| WT | CCTAGAGGATATACTACTTGGGTGAATACCATACAGACAAATGGTCTATTAAATGAAGCT | 480 |
| CO | CCCAGGGGCTATACCACCTGGGTCAACACCATCCAGACAAACGGACTTTTGAACGAAGCC | 480 |
| WT | AGTCAAACTTATTTGGGATATTATCAGTAGACTGTACTTCTGAAGAAATGAATGCATTT | 540 |
| CO | TCCCAGAACCTGTTCCGCATCCTGTCTGTGGACTGCACCTCCGAAGAAATGAATGCTTTT | 540 |
| WT | TTGGATGTGGTACCTGGCCAGGCAGGACAAAAGCAGATATTACTTGATGCAATTGATAAG | 600 |
| CO | CTCGACGTGGTGCCAGGACAGGCTGGACAGAAACAGATCCTGCTCGATGCCATTGACAAG | 600 |
| WT | ATAGCAGATGATTGGGATAATAGACATCCATTACCGAATGCTCCACTGGTGGCACCACCA | 660 |
| CO | ATCGCCGACGACTGGGATAATCGCCACCCCTGCCAAACGCCCCTCTGGTGGCTCCCCCA | 660 |
| WT | CAAGGGCCTATTCCCATGACAGCAAGGTTTATTAGAGGTTTAGGAGTACCTAGAGAAAGA | 720 |
| CO | CAGGGGCCTATCCCTATGACCGCTAGGTTTCATTAGGGGACTGGGGGTGCCCGCAACGC | 720 |
| WT | CAGATGGAGCCTGCTTTTGATCAGTTTAGGCAGACATATAGACAATGGATAATAGAAGCC | 780 |
| CO | CAGATGGAGCCAGCATTTGACCAATTAGGCAGACCTACAGACAGTGGATCATCGAAGCC | 780 |
| WT | ATGTCAGAAGGCATCAAAGTGATGATTTGGAAAACTAAAGCTCAAAATATTAGGCAAGGA | 840 |
| CO | ATGAGCGAGGGGATTAAAGTCATGATCGGAAAGCCCAAGGCACAGAACATCAGGCAGGGG | 840 |
| WT | GCTAAGGAACCTTACCCAGAATTTGTAGACAGACTATTATCCCAAATAAAAAGTGAGGGA | 900 |
| CO | GCCAAGGAACCATACCCCTGAGTTTGTGACAGGCTTCTGTCCAGATTAAATCCGAAGGC | 900 |
| WT | CATCCACAGAGATTTCAAATTTCTTGACTGATACACTGACTATTTCAGAACGCAAAATGAG | 960 |
| CO | CACCCCTCAGGAGATCTCCAAGTTCTTGACAGACACACTGACTATCCAAAATGCAAAATGAA | 960 |

| | | |
|----|---|------|
| WT | GAATGTAGAAATGCTATGAGACATTTAAGACCAGAGGATACATTAGAAGAGAAAATGTAT | 1020 |
| CO | GAGTGCAGAAACGCCATGAGGCACCTCAGACCTGAAGATACCTGGAGGAGAAAATGTAT | 1020 |
| WT | GCTTGCAGAGACATTTGGAACACAAAACAAAAGATGATGTTATTGGCAAAAGCACTTCAG | 1080 |
| CO | GCATGTGCGACATTTGGCACTACCAAGCAAAAGATGATGCTGCTCGCCAAGGCTCTGCAA | 1080 |
| WT | ACTGGTCTTGCGGGCCCATTTAAAGGTGGAGCCTTGAAAGGAGGGCCACTAAAGGCAGCA | 1140 |
| CO | ACCGGCCTGGCTGGTCCATTCAAAGGAGGAGCACTGAAGGGAGGTCCATTGAAAGCTGCA | 1140 |
| WT | CAAACATGTTATAACTGTGGGAAGCCAGGACATTTATCTAGTCAATGTAGAGCACCTAAA | 1200 |
| CO | CAAACATGTTATAATGTGGGAAGCCAGGACATTTATCTAGTCAATGTAGAGCACCTAAA | 1200 |
| WT | GTCTGTTTTAAATGTAAACAGCCTGGACATTTCTCAAAGCAATGCAGAAGTGTTCAAAA | 1260 |
| CO | GTCTGTTTTAAATGTAAACAGCCTGGACATTTCTCAAAGCAATGCAGAAGTGTTCAAAA | 1260 |
| WT | AACGGGAAGCAAGGGGCTCAAGGGAGGCCCCAGAACAAACTTTCCCGATACACAGAAG | 1320 |
| CO | AACGGGAAGCAAGGGGCTCAAGGGAGGCCCCAGAACAAACTTTCCCGATACACAGAAG | 1320 |
| WT | AGTCAGCACAAACAATCTGTTGTACAAGAGACTCCTCAGACTCAAAATCTGTACCCAGAT | 1380 |
| CO | AGTCAGCACAAACAATCTGTTGTACAAGAGACTCCTCAGACTCAAAATCTGTACCCAGAT | 1380 |
| WT | CTGAGCGAAATAAAAAGGAATACAATGTCAAGGAGAAGGATCAAGTAGAGGATCTCAAC | 1440 |
| CO | CTGAGCGAAATAAAAAGGAATACAATGTCAAGGAGAAGGATCAAGTAGAGGATCTCAAC | 1440 |
| WT | CTGGACAGTTTGTGGGAGTAACATATAATCTAGAGAAAAGGCCTACTACAATAGTATTAA | 1500 |
| CO | CTGGACAGTTTGTGGGAGTAACATACAATCTCGAGAAGAGGCCCTACTACCATCGTCTGTA | 1500 |
| WT | TTAATGATACTCCCTTAAATGTACTGTTAGACACAGGAGCAGATACTTCAGTGTGACTA | 1560 |
| CO | TCAATGACACCCCTCTTAATGTGCTGCTGGACACCGGAGCCGACACCAGCGTTCCTACTA | 1560 |
| WT | CTGCACATTATAATAGGTTAAATATAGAGGGAGAAAATATCAAGGGACGGGAATAATAG | 1620 |
| CO | CTGCTCACTATAACAGACTGAAATACAGAGGAAGGAAATACCAGGGCACAGGCATCATCG | 1620 |
| WT | GAGTGGGAGGAAATGTGCAACATTTTCTACGCTGTGACTATAAAGAAAAGGGTAGAC | 1680 |
| CO | GCCTTGGAGGCAACGTGCAACCTTTTCCACTCCTGTCAACATCAAAAAGAGGGGAGAC | 1680 |
| WT | ACATTAAAGACAAGAAATGCTAGTGGCAGATATTCAGTGACTATTTTGGGACGAGATATTC | 1740 |
| CO | ACATTAAACCAGAATGCTGGTGGCGACATCCCGTCACCATCCTTGGCAGAGACATTC | 1740 |
| WT | TTCAAGGACTTAGGTGCAAAATTTGGTTTGGCACAGCTCTCCAAGGAAATAAAATTTAGAA | 1800 |
| CO | TCCAGGACCTGGGCGCTAAACTCGTGTGGCACAACTGTCTAAGGAAATCAAGTTCCGCA | 1800 |
| WT | AAATAGAGTTAAAGAGGGCACAAATGGGGCCAAAATTCCTCAATGGCCACTCACTAAGG | 1860 |
| CO | AGATCGAGCTGAAGAGGGCACAAATGGGTCCAAAATCCCCAGTGGCCCTTGACCAAG | 1860 |
| WT | AGAACTAGAAGGGGCCAAAGAGATAGTCCAAAGACTATTGTGAGAGGGAAAATATCAG | 1920 |
| CO | AGAAGCTTGAGGGCGCTAAGGAAATCGTGCAGCGCCTGCTTTCTGAGGGCAAGATTAGCG | 1920 |
| WT | AAGCTAGTGACAATAATCCTTATAATTACCCATATTTGTAATAAAAAGAGGCTGGCA | 1980 |
| CO | AGGCCAGCGACAATAACCCCTTACACAGCCCCATCTTTGTGATTAAAGAAAGGAGCGGCA | 1980 |

| | | |
|----|---|------|
| WT | AATGGAGGTTATTACAAGATCTGAGAGAATTAAACAAAACAGTACAAGTAGGAACGGAAA | 2040 |
| CO | AATGGAGACTCCTGCAGGACCTGAGGGAACCAACAAGACCGTCCAGGTCGGAACGAGA | 2040 |
| WT | TATCCAGAGGATTGCCTCACC CGGAGGATTAATTAAATGTAAACACATGACTGTATTAG | 2100 |
| CO | TCTCTCGCGACTGCCTCACC CGGCGGCTGATTAAATGCAAGCACATGACAGTCTTG | 2100 |
| WT | ATATTGGAGATGCATATTTCACTATACCCCTTAGATCCAGAGTTTAGACCATATACAGCTT | 2160 |
| CO | ACATTGGAGACGCTTATTTTACCATCCCCCTCGATCCTGAATTTGCCCCCTATCTGCTT | 2160 |
| WT | TCACTATTCCCTCCATTAAATCATCAAGAACCAGATAAAAGATATGTGTGGAATGTTTAC | 2220 |
| CO | TTACCATCCCCAGCATCAATCACCAGGAGCCCGATAAACGCTATGTGTGGAAGTGCCTCC | 2220 |
| WT | CACAAGGATTCGTGTTGAGCCCATATATATATCAGAAAACATTACAGGAAATTTTACAAC | 2280 |
| CO | CCCAGGGATTTGTGCTTAGCCCCCTACATTTACCAGAAGACACTTCAAGAGATCCTCCAAC | 2280 |
| WT | CTTTAGGGAAAGATATCCTGAAGTACAATTGTATCAATATATGGATGATTTGTTTATGG | 2340 |
| CO | CTTTCCGCGAAAGATACCCAGAGGTTCAACTCTACCAATATATGGACGACCTGTTTATGG | 2340 |
| WT | GAAGTAATGGTTCTAAAAACAACACAAAGAGTTAATCATAGAATTAAGGGCGATCTTAC | 2400 |
| CO | GGTCCAACGGGTCTAAGAAGCAGCACAAAGAACTCATCATCGAAGTGAAGGCAATCCTCC | 2400 |
| WT | TGGAAAAGGGTTTGGAGACACCAGATGATAAATTACAAGAAGTGCCACCTTATAGCTGGC | 2460 |
| CO | TGGAGAAAGGCTTCGAGACACCCGACGACAGCTGCAAGAAGTTCCCTCCATATAGCTGGC | 2460 |
| WT | TAGGTTATCAACTTTGTCTGAAAATTGGAAAGTACAAAAAATGCAATTAGACATGGTAA | 2520 |
| CO | TGGGCTACCAGCTTTGCCCTGAAAAGTGGAAAGTCCAGAAGATGCAGTTGGATATGGTCA | 2520 |
| WT | AGAATCCAACCCTTAATGATGTGCAAAAATTAATGGGGAAATATAACATGGATGAGCTCAG | 2580 |
| CO | AGAACCCAACACTGAACGACGTCAGAAAGCTCATGGGCAATATTACCTGGATGAGCTCCG | 2580 |
| WT | GGATCCCAGGGTTGACAGTAAAACACATTGCAGCTACTACTAAGGGATGTTTAGAGTTGA | 2640 |
| CO | GAATCCCTGGGCTTACCGTTAAGCACATTGCCGCACTACAAAAGGATGCCTGGAGTTGA | 2640 |
| WT | ATCAAAAAGTAATTTGGACGGGAAGAGGCACAAAAGAGTTAGAAGAAAATAATGAGAAGA | 2700 |
| CO | ACCAGAAGGTCAATTGGACAGAGGAAGCTCAGAAGGAACTGGAGGAGAATAATGAAAAGA | 2700 |
| WT | TTAAAAATGCTCAAGGGTTACAATATTATAATCCAGAAGAAGAAATGTTATGTGAGGTTG | 2760 |
| CO | TTAAGAATGCTCAAGGGCTCCAATACTACAATCCCGAAGAAGAAATGTTGTGCGAGGTCG | 2760 |
| WT | AAATTACAAAAAATTATGAGGCAACTTATGTTATAAAACAATCACAAGGAATCCTATGGG | 2820 |
| CO | AAATCACTAAGAACTACGAAGCCACCTATGTTCATCAACAGTCCCAAGGCATCTTGTGGG | 2820 |
| WT | CAGGTAAAAAGATTATGAAGGCTAATAAGGGATGGTCAACAGTAAAAAATTTAATGTTAT | 2880 |
| CO | CCGGAAAGAAAATCATGAAGGCCACAAAGGCTGGTCCACCGTTAAAAATCTGATGCTCC | 2880 |
| WT | TGTTGCAACATGTGGCAACAGAAAGTATTACTAGAGTAGGAAAATGTCCAACGTTTAAAG | 2940 |
| CO | TGCTCCAGCACGTCGCCACCGAGTCTATCACCCGCGTCGGCAAGTGCCCCACCTTCAAAG | 2940 |
| WT | TACCATTTACCAAAGAGCAAGTAATGTGGGAAATGCAAAAAGGATGGTATTATCTTGGC | 3000 |
| CO | TTCCCTTCACTAAGGAGCAGGTGATGTGGGAGATGCAAAAAGGCTGGTACTACTCTTGGC | 3000 |

ES 2 618 508 T3

| | | |
|----|---|------|
| WT | TCCCAGAAATAGTATATACACATCAAGTAGTTCATGATGATTGGAGAATGAAATTGGTAG | 3060 |
| CO | TTCCCGAGATCGTCTACACCCACCAAGTGGTGACGACGACTGGAGAATGAAGCTTGTGC | 3060 |
| WT | AAGAACCTACATCAGGAATAACAATATACACTGATGGGGGAAAACAAAATGGAGAAGGAA | 3120 |
| CO | AGGAGCCCACTAGC3GAATTACAATCTATACCGACGGCGGAAAGCAAACGGAGAGGGAA | 3120 |
| WT | TAGCAGCTTATGTGACCAGTAATGGGAGAACTAAACAGAAAAGGTTAGGACCTGTCACTC | 3180 |
| CO | TCGCTGCATACGTACATCTAACGGCCGACCAAGCAAAGAGGGCTCGGCCCTGTCACTC | 3180 |
| WT | ATCAAGTTGCTGAAAGAATGGCAATACAAATGGCATTAGAGGATACCAGAGATAAACAAG | 3240 |
| CO | ACCAGGTGGCTGAGAGGATGGCTATCCAGATGGCCCTTGAGGACACTAGAGACAAGCAGG | 3240 |
| WT | TAAATATAGTAACTGATAGTTATTATTGTTGGAAAAATATTACAGAAGGATTAGGTTTATG | 3300 |
| CO | TGAACATTGTGACTGACAGCTACTACTGCTGGAAAAACATCACAGAGGGCCCTTGGCCCTGG | 3300 |
| WT | AAGGACCACAAAGTCCTTGGTGGCCCTATAATACAAAATATACGAGAAAAAGAGATAGTTT | 3360 |
| CO | AGGGACCCCACTCTCCCTGGTGGCCCTATCATCCAGAATATCCGCGAAAAGGAAATTGTCT | 3360 |
| WT | ATTTTGCTTGGGTACCTGGTCACAAAGGGATATATGGTAATCAATTGGCAGATGAAGCCG | 3420 |
| CO | ATTTGCGCCTGGGTGCTTGGACACAAAGGAATTTACGGCAACCAACTCGCCGATGAAGCCG | 3420 |
| WT | CAAAAATAAAGAGAAATCATGCTAGCATACCAAGGCACACAAATTAAAGAGAAAAGAG | 3480 |
| CO | CCAAATTAAGAGGAAATCATGCTTGCCCTACAGGGCACACAGATTAAAGGAGAGAGAG | 3480 |
| WT | ATGAAGATGCAGGGTTTGACTTATGTGTTCCTTATGACATCATGTACCTGTATCTGACA | 3540 |
| CO | ACGAGGACGCTGGCTTTGACCTGTGTGTGCCATACGACATCATGATTCCCGTTAGCGACA | 3540 |
| WT | CAAAAATCATACCCACAGATGTAAAAATTCAAGTTCCTCCTAATAGCTTTGGATGGGTCA | 3600 |
| CO | CAAAGATCATTCCAACCGATGTCAAGATCCAGGTGCCACCCAATTCATTGTTGGTGGGTGA | 3600 |
| WT | CTGGGAAATCATCAATGGCAAAACAGGGGTATTATTAATTAAATGGAGGAATAATTGATGAAG | 3660 |
| CO | CCGAAAGTCCAGCATGGCTAAGCAGGGTCTTCTGATTAAACGGGGGAATCATTGATGAAG | 3660 |
| WT | GATATACAGGAGAAATACAGTGATATGTACTAATATTGGAAAAAGTAATATTAAATTAA | 3720 |
| CO | GATACACCGCGAAATCCAGGTGATCTGCACAAATATCGGCAAAAGCAATATTAAAGCTTA | 3720 |
| WT | TAGAGGGACAAAAATTTGCACAAATTAATTACTACAGCATCACTCAAATTCAGACAGC | 3780 |
| CO | TCAAGGGCAGAAAGTTGCTCAACTCATCATCCTCCAGCACCACAGCAATTCAAGACAAC | 3780 |
| WT | CTTGGGATGAAAAATAAATATCTCAGAGAGGGGATAAAGGATTGGGAAGTACAGGAGTAT | 3840 |
| CO | CTTGGGACGAAAAACAAGATTAGCCAGAGAGGTGACAAGGGCTTCGGCAGCACAGGTGTGT | 3840 |
| WT | TCTGGGTAGAAAAATATTCAAGGAAGCACAGATGAACATGAGAATTGGCATACATCACCAA | 3900 |
| CO | TCTGGGTGGAGAACATCCAGGAAGCACAGGACGAGCACGAGAATTGGCACACCTCCCCTA | 3900 |
| WT | AGATATTGGCAAGAAATTATAAGATAACCATGACTGTAGCAAAACAGATAACTCAAGAAT | 3960 |
| CO | AGATTTTGGCCCGCAATTACAAGATCCCACTGACTGTGGCTAAGCAGATCACACAGGAAT | 3960 |
| WT | GTCCTCATTGCACTAAGCAAGGATCAGGACCTGCAGGTTGTGTCAATGAGATCTCCTAATC | 4020 |
| CO | GCCCCCACTGCACCAACAAGGTTCTGGCCCGCGCTGCGTGATGAGGTCCCCCAATC | 4020 |

ES 2 618 508 T3

| | | |
|----|---|------|
| WT | ATTGGCAGGCAGATTGCACACATTTGGACAATAAGATAATATTGACTTTTGTAGAGTCAA | 4080 |
| CO | ACTGGCAGGCAGATTGCACCCACCTCGACAACAAAATTATCCTGACCTTCGTGGAGAGCA | 4080 |
| WT | ATTTCAGGATACATACATGCTACATTATTGTCAAAGAAAAATGCATTATGTACTTCATTGG | 4140 |
| CO | ATTCCGGCTACATCCAAGCAACTCCTCTCCAAGGAAAAATGCATTGTGCACCTCCCTCG | 4140 |
| WT | CTATTTTAGAATGGGCAAGATTGTTTTACCAAGTCCTTACACACAGATAACGGCACTA | 4200 |
| CO | CAATTCTGGAATGGGCCAGGCTGTTCTCTCCAATATCCCTGCACACCGACAACGGCACCA | 4200 |
| WT | ATTTTGTGGCAGAACCAGTTGTAAATTTGTTGAAGTTCCTAAAGATAGCACATACCACAG | 4260 |
| CO | ACTTTGTGGCTGAACCTGTGGTGAATCTGCTGAAGTTCCTGAAAATCGCCACACCACTG | 4260 |
| WT | GAATACCATATCATCCAGAAAGTCAGGGTATTGTAGAAAGGGCAAATAGGACCTTGAAAG | 4320 |
| CO | GCATTCCCTATCACCTGAAAGCCAGGGCATTTGTCGAGAGGGCCAACAGAACTCTGAAAG | 4320 |
| WT | AGAAGATTCAAAGTCATAGAGACAACACTCAAACACTGGAGGCAGCTTTACAACCTTGCTC | 4380 |
| CO | AAAAGATCCAATCTCACAGAGACAATACACAGACATTTGGAGGCCGCACTTCAGCTCGCCC | 4380 |
| WT | TCATTACTTGTAACAAAGGGAGGGAAAGTATGGCAGGACAGACACCATGGGAAGTATTTA | 4440 |
| CO | TTATCACCTGCAACAAAGGAAGAGAAAGCATGGGCGGCCAGACCCCTGGGAGGTCTTCA | 4440 |
| WT | TCACTAATCAAGCACAAGTAATACATGAGAACTTTTACTACAGCAAGCACAATCCTCCA | 4500 |
| CO | TCACTAACCAGGCCAGGTCATCCATGAAAAGCTGCTCTTGACAGCAGGCCAGTCCCTCCA | 4500 |
| WT | AAAAATTTGTTTTTACAAAATCCCTGGTGAACATGATTGGAAGGGACCTACTAGGGTGC | 4560 |
| CO | AAAAGTTCTGCTTTTATAAGATCCCCGGTGAGCACGACTGGAAAGGTCCTACAAGAGTTT | 4560 |
| WT | TGTGGAAGGGTGATGGTGCAGTAGTAGTTAATGATGAAGGAAAGGGAATAATTGCTGTAC | 4620 |
| CO | TGTGGAAGGAGACGGCGCAGTTGTGGTGAACGATGAGGGCAAGGGGATCATCGCTGTGC | 4620 |
| WT | CATTAACCAGGACTANGTTACTAATAAAACCAAATTGA | 4658 |
| CO | CCCTGACACGCACCAAGCTTCTCATCAAGCCAAACTGA | 4658 |

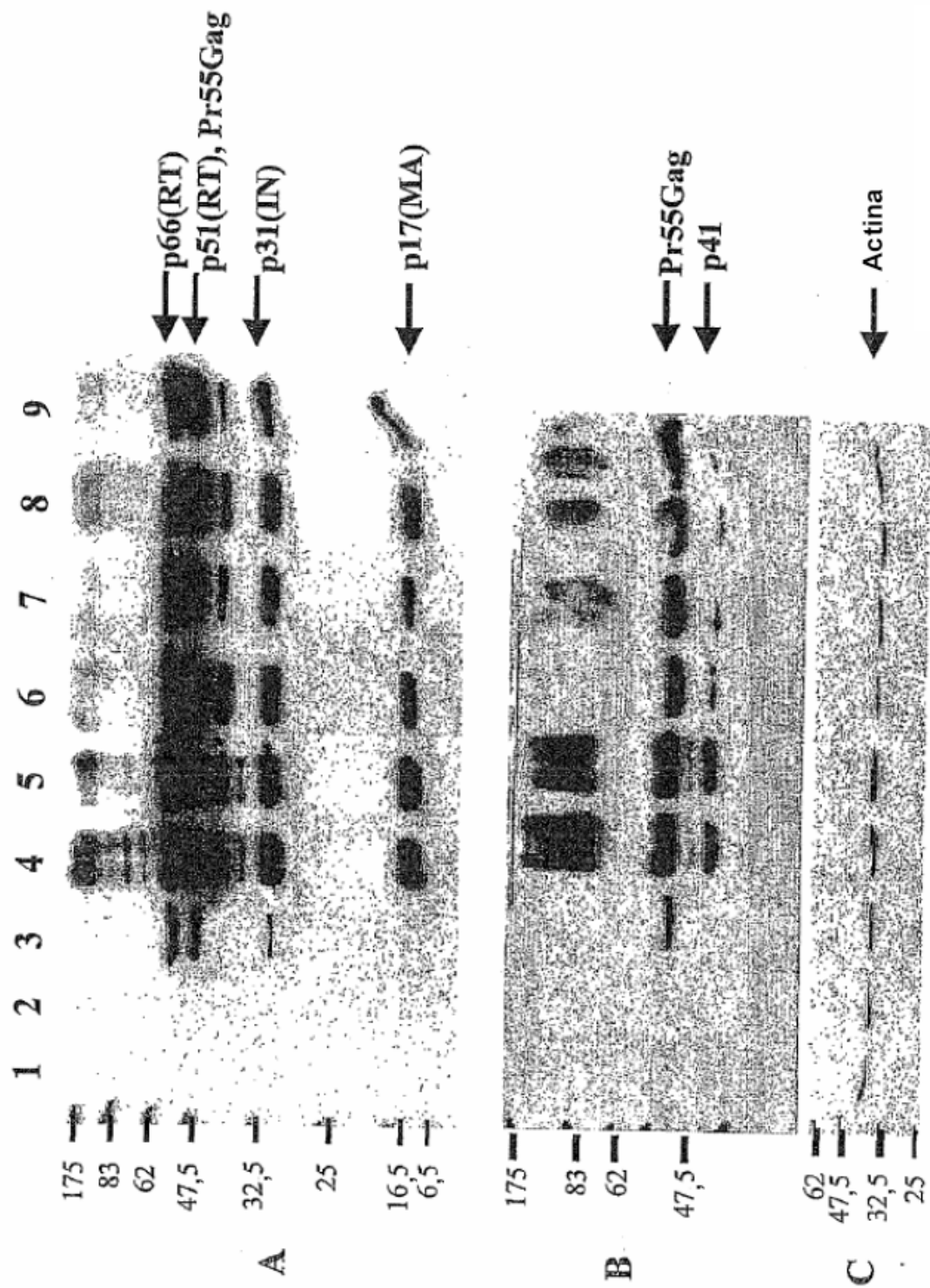


FIGURA 10

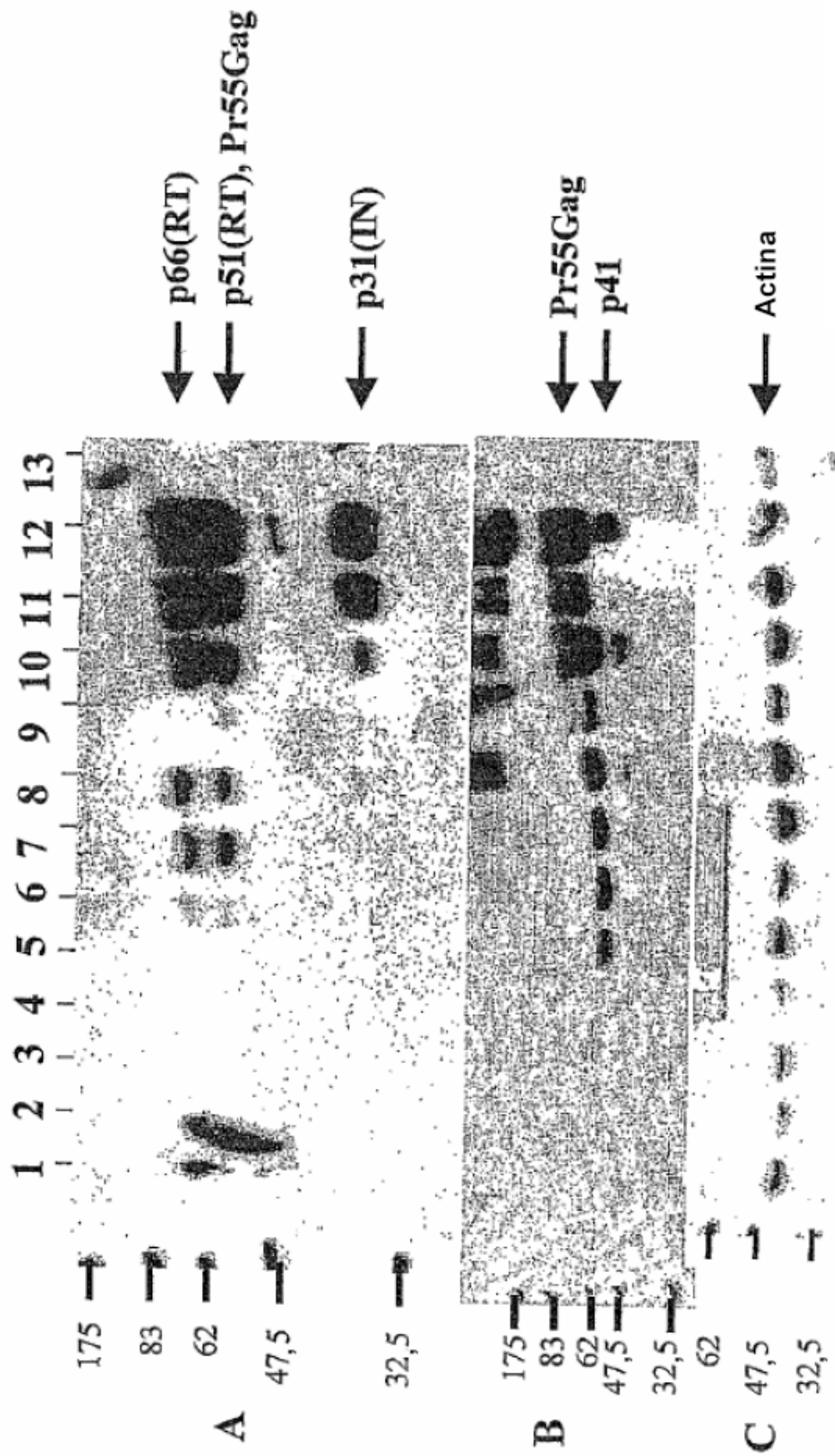


FIGURA 11

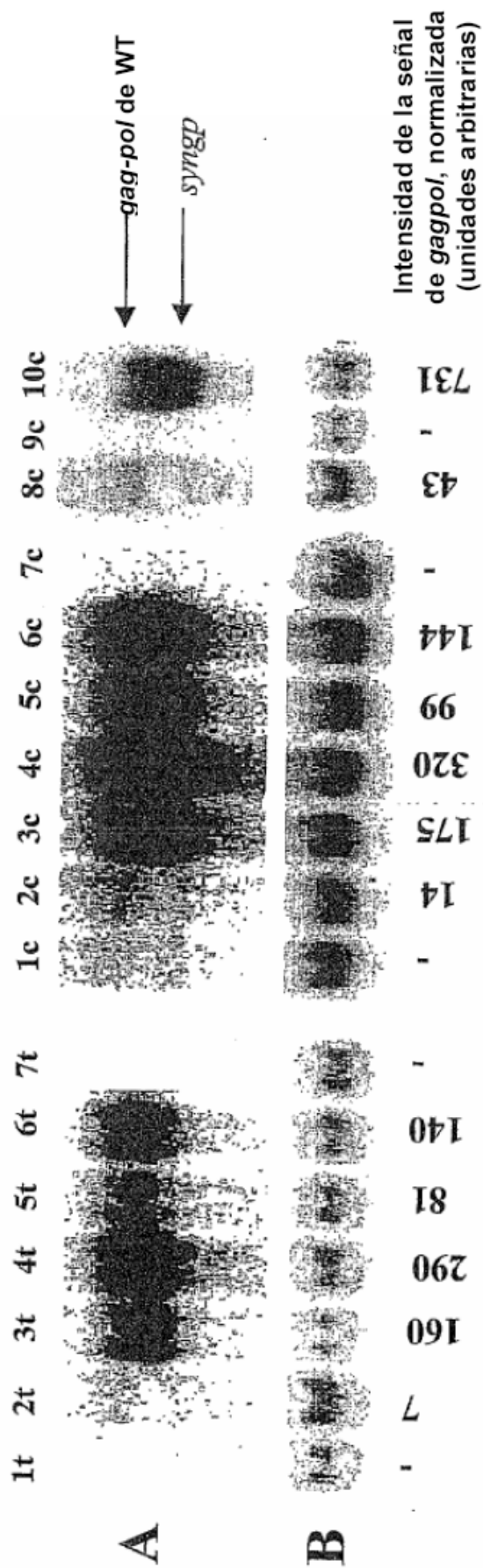


FIGURA 12

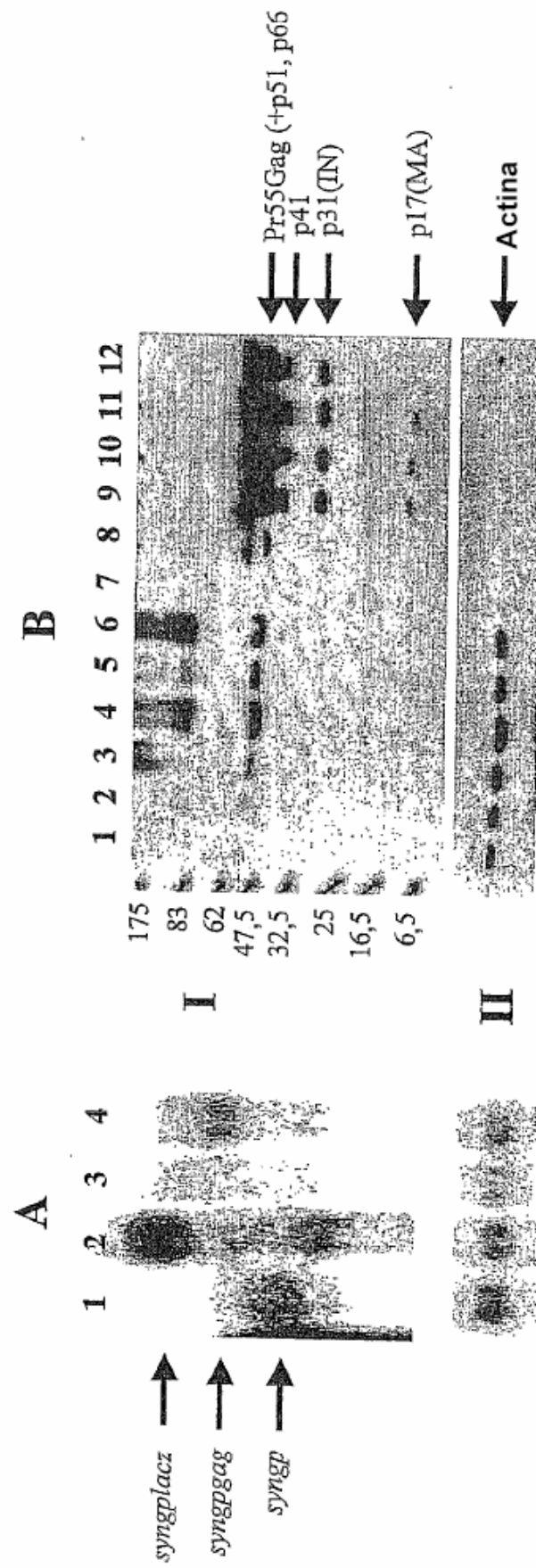


FIGURA 13

| | |
|--------|--|
| pSYN6 | CMVp—Syn <i>gp</i> —HXB2 <i>gag</i> —pA |
| pSYN7 | CMVp—Syn <i>gp</i> —HXB2 <i>gag,r</i> —pA |
| pSYN8 | CMVp—Syn <i>gp</i> — <i>Lac Z</i> —pA |
| pSYN9 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> —Syn <i>gp</i> —pA |
| pSYN10 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> —Syn <i>gp</i> —RRE—pA |
| pSYN11 | CMVp—HXB2 <i>gag,r</i> —Syn <i>gp</i> —RRE—pA |
| pSYN12 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> -ΔATG—Syn <i>gp</i> —pA |
| pSYN13 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> -fr.sh.—Syn <i>gp</i> —pA |
| pSYN14 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> -ΔATG—Syn <i>gp</i> —RRE—pA |
| pSYN15 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> 625-1503—Syn <i>gp</i> —pA |
| pSYN17 | CMVp—HXB2 <i>gag</i> 1-625—Syn <i>gp</i> —pA |

FIGURA 14

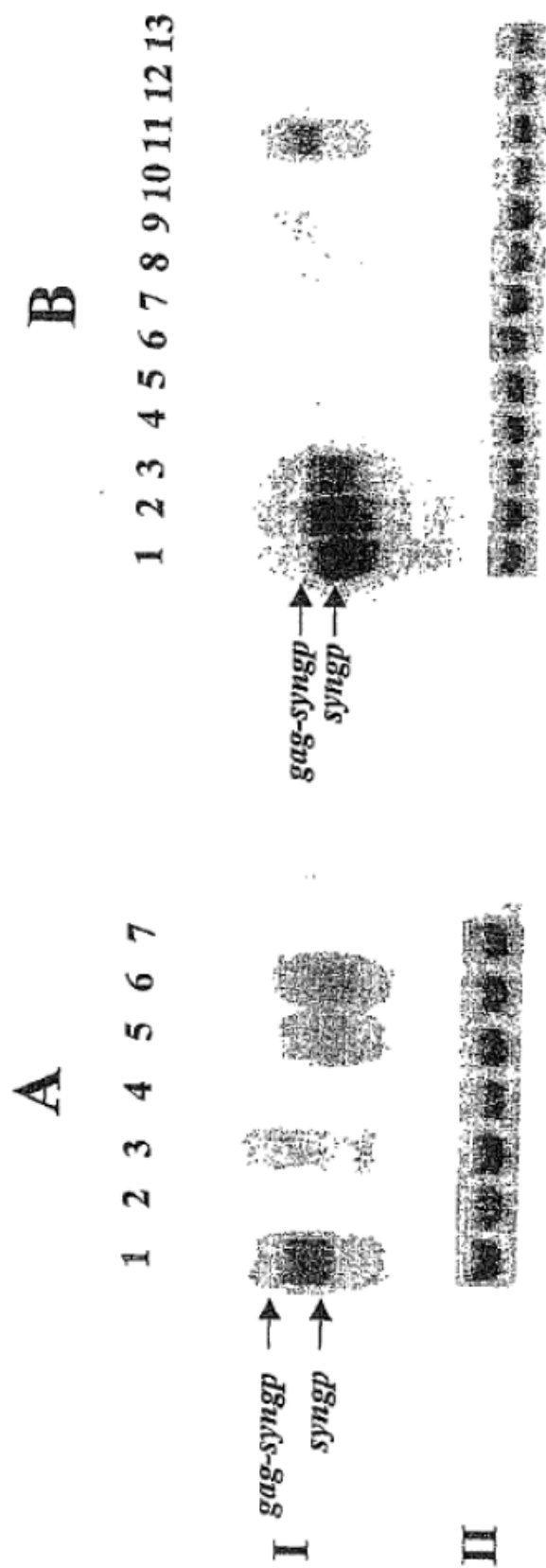


FIGURA 15

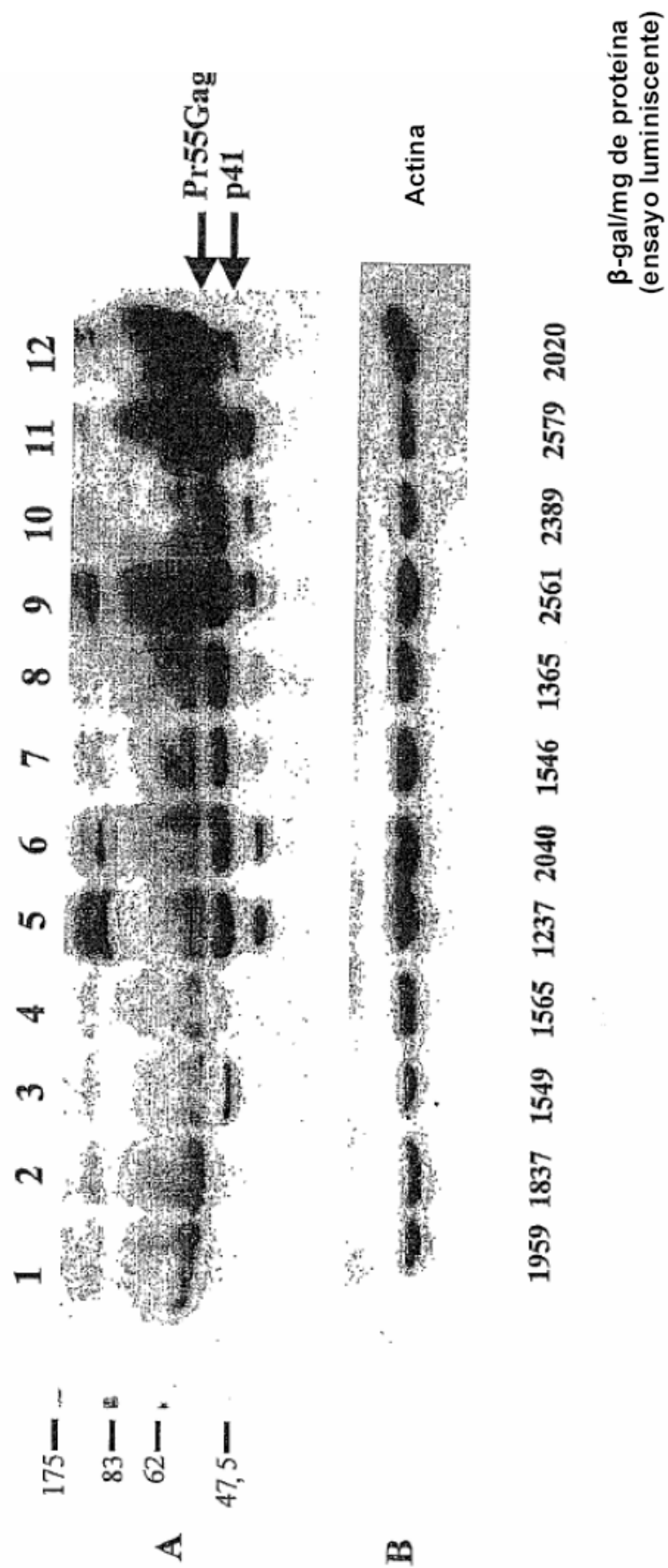


FIGURA 16



FIGURA 17

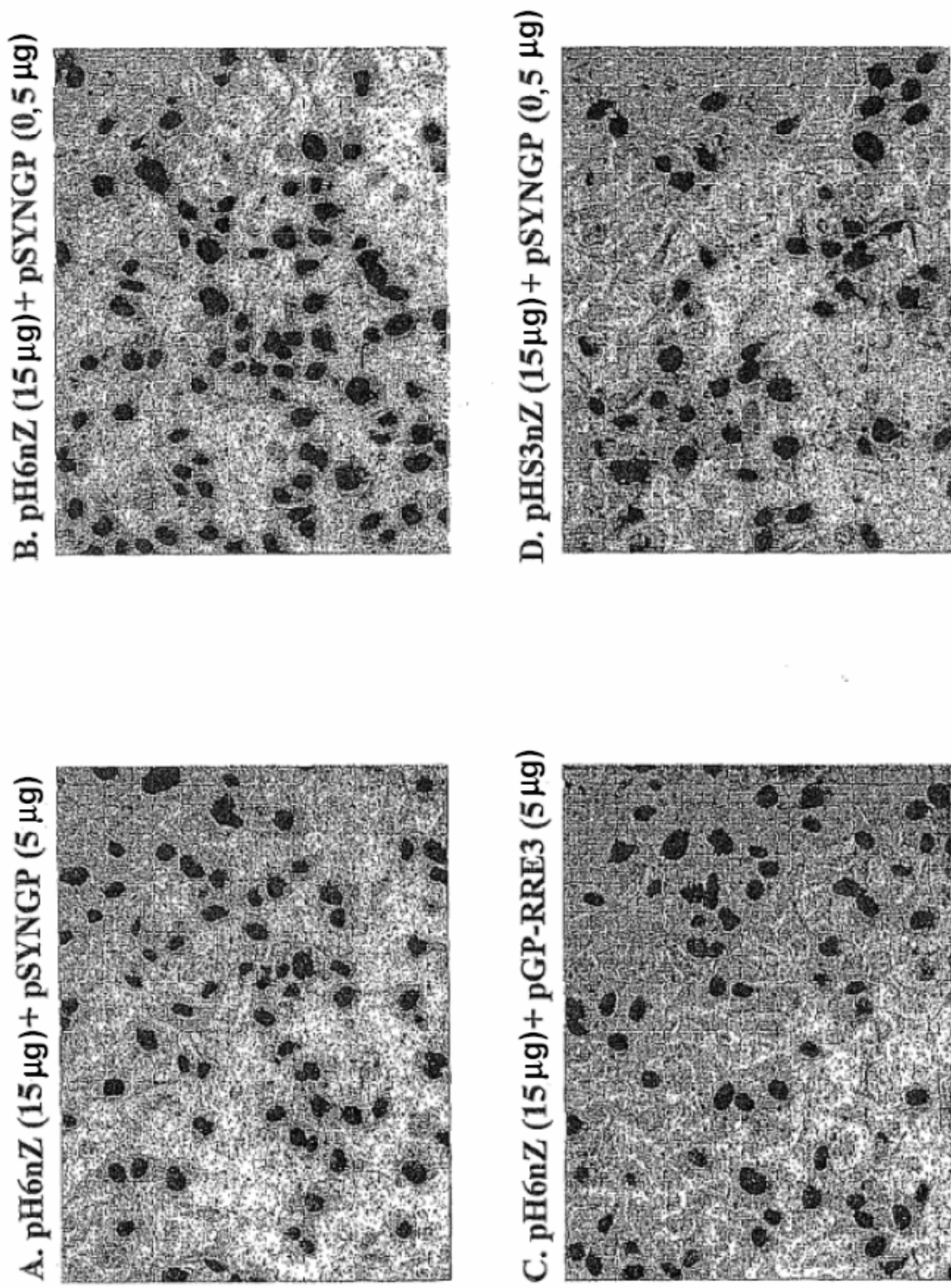


FIGURA 18

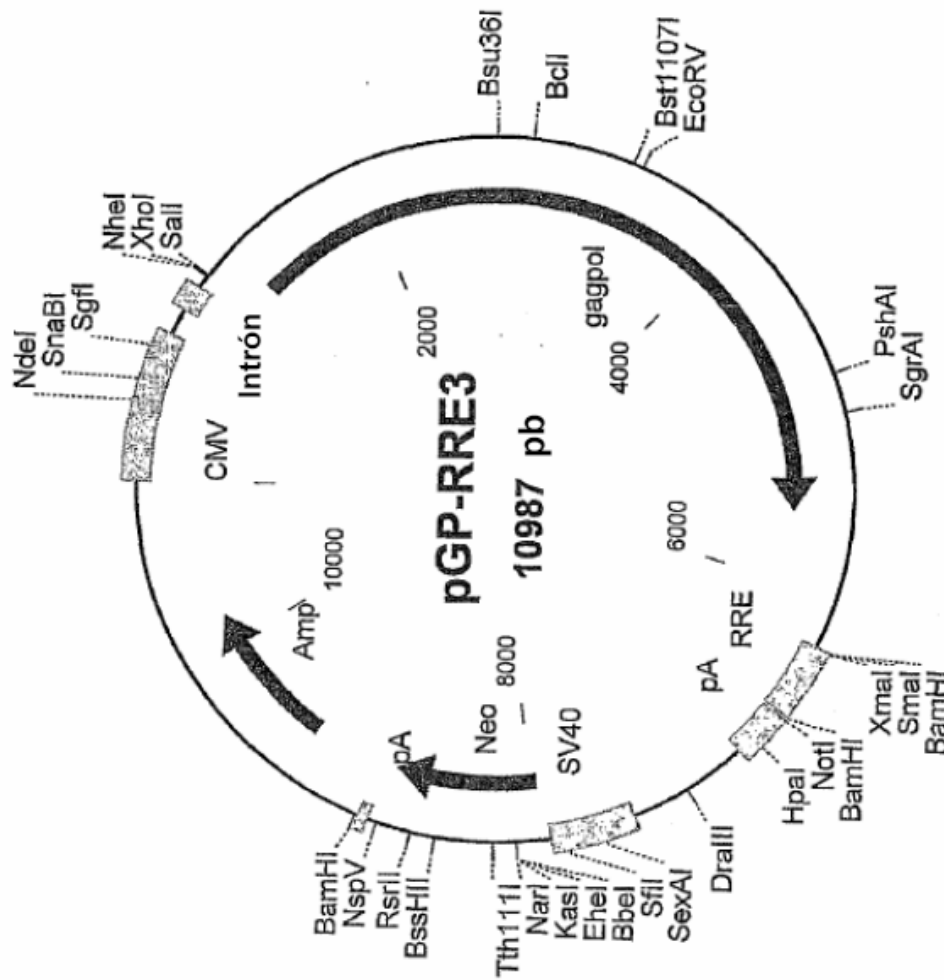


FIGURA 19

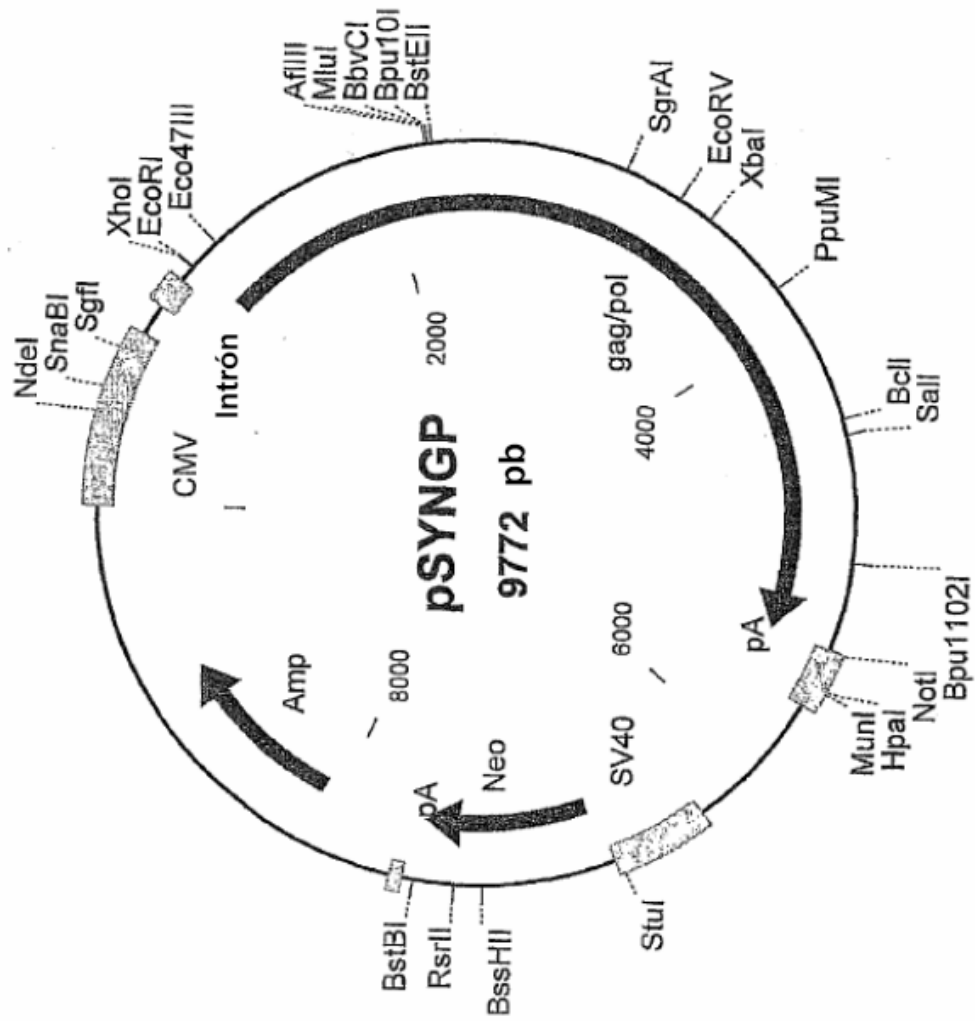


FIGURA 20

FIGURA 21

| Cantidad de pH6nZ (μ g) | Proporción de plásmido de expresión de <i>gagpol</i> con respecto a pH6nZ (μ g/ μ g) | Título, pGP-RRE3 | Título, pSYNGP | Título, pSYNGP-RRE | Título, pSYNGP-ERR |
|------------------------------|---|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 5 | 1:1 | 6×10^5 | 5×10^5 | 4×10^5 | 3×10^5 |
| 12,5 | 1:2,5 | 8×10^5 | $6,5 \times 10^5$ | | |
| 10 | 1:10 | 3×10^5 | 4×10^5 | | |
| 5 | 1:20 | $3,5 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^5$ | | |
| 12,5 | 1:50 | $3,5 \times 10^4$ | 3×10^5 | 3×10^5 | 3×10^5 |
| 18 | 1:180 | $2,5 \times 10^4$ | 3×10^5 | | |

FIGURA 22

| Vector de expresión de gag-pol | Genoma del vector | Expresión de Rev | Título (UI/ml) ^a |
|--------------------------------|-------------------|------------------|-----------------------------|
| pGP-RRE3 | pH6nZ | Sí / de pH6Z | 8,0±0,2 x 10 ⁵ |
| pGP-RRE3 | pH6.1nZ | No | 2,1±0,3 x 10 ³ |
| pGP-RRE3 | pH6.1nZ | Sí / de pCMV-Rev | 4,1±0,3 x 10 ⁴ |
| pGP-RRE3 | pH6.2nZ | No | 1,7±0,4 x 10 ³ |
| pGP-RRE3 | pH6.2nZ | Sí / de pCMV-Rev | 5,6±0,3 x 10 ⁴ |
| pSYNGP | pH6nZ | Sí / de pH6Z | 7,8±0,2 x 10 ⁵ |
| pSYNGP | pH6.1nZ | No | 5,4±0,3 x 10 ⁴ |
| pSYNGP | pH6.1nZ | Sí / de pCMV-Rev | 5,2±0,4 x 10 ⁴ |
| pSYNGP | pH6.2nZ | No | 5,0±0,2 x 10 ⁴ |
| pSYNGP | pH6.2nZ | Sí / de pCMV-Rev | 5,5±0,3 x 10 ⁴ |

FIGURA 23

| Genoma del vector | Longitud de gag (nt) | Mutación SD | pSYNGP | pGP-RRE3 | pGP-RRE + Rev * |
|-------------------|----------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| pH6nZ | 625 | No | $6,7 \pm 0,7 \times 10^5$ | No realizado | No realizado |
| pH6.1nZ | 625 | No | $3,2 \pm 0,1 \times 10^4$ | No realizado | No realizado |
| pH6.2nZ | 527 | No | $2,7 \pm 0,3 \times 10^4$ | No realizado | No realizado |
| pHS1nZ | 40 | No | $2,1 \pm 0,4 \times 10^4$ | $2,1 \pm 0,9 \times 10^3$ | $1,4 \pm 0,3 \times 10^4$ |
| pHS2nZ | 260 | No | $1,5 \pm 0,3 \times 10^4$ | $4,2 \pm 0,6 \times 10^3$ | $3,0 \pm 0,5 \times 10^4$ |
| pHS3nZ | 360 | No | $1,3 \pm 0,3 \times 10^5$ | $6,5 \pm 0,7 \times 10^3$ | $1,7 \pm 0,4 \times 10^5$ |
| pHS4nZ | 625 | No | $1,0 \pm 0,9 \times 10^4$ | $1,2 \pm 0,7 \times 10^3$ | $1,0 \pm 0,3 \times 10^4$ |
| pHS5nZ | 40 | Sí | $2,0 \pm 0,5 \times 10^4$ | $6,0 \pm 0,8 \times 10^2$ | $2,3 \pm 0,5 \times 10^4$ |
| pHS6nZ | 260 | Sí | $1,0 \pm 0,2 \times 10^4$ | $8,1 \pm 0,6 \times 10^2$ | $1,0 \pm 0,4 \times 10^4$ |
| pHS7nZ | 360 | Sí | $1,9 \pm \times 10^4$ | $2,4 \pm 0,9 \times 10^3$ | $4,2 \pm 0,8 \times 10^4$ |
| pHS8nZ | 625 | Sí | $8,0 \pm 1,0 \times 10^3$ | $1,0 \pm 0,5 \times 10^3$ | $4,0 \pm 0,9 \times 10^3$ |

FIGURA 24

| Genoma del vector | pSYNGP | PSYNGP + Rev * |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| pH6nZ | $6,5 \times 10^5$ | $6,9 \times 10^5$ |
| pH6.1nZ | $1,5 \times 10^4$ | $1,7 \times 10^4$ |
| pH6.1nZR | $2,3 \times 10^3$ | $1,6 \times 10^5$ |
| pHS1nZ | $8,5 \times 10^3$ | $8,4 \times 10^3$ |
| pHS1nZR | $8,1 \times 10^3$ | $8,8 \times 10^4$ |
| pHS3nZ | $1,2 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^5$ |
| pHS3nZR | $2,5 \times 10^3$ | $4,8 \times 10^5$ |
| pHS7nZ | $7,3 \times 10^3$ | $7,0 \times 10^3$ |
| pHS7nZR | $3,4 \times 10^3$ | $5,8 \times 10^3$ |

FIGURA 25

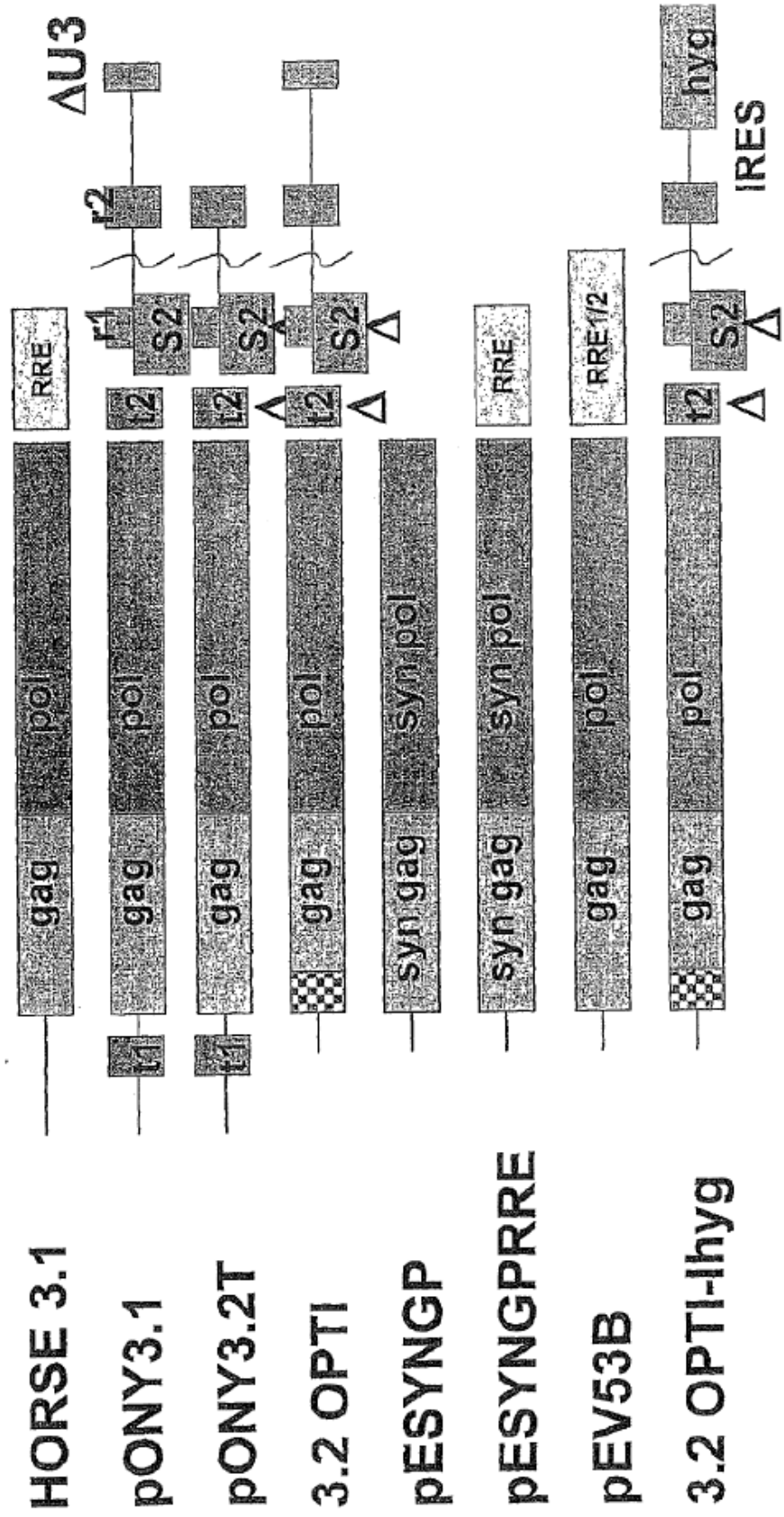
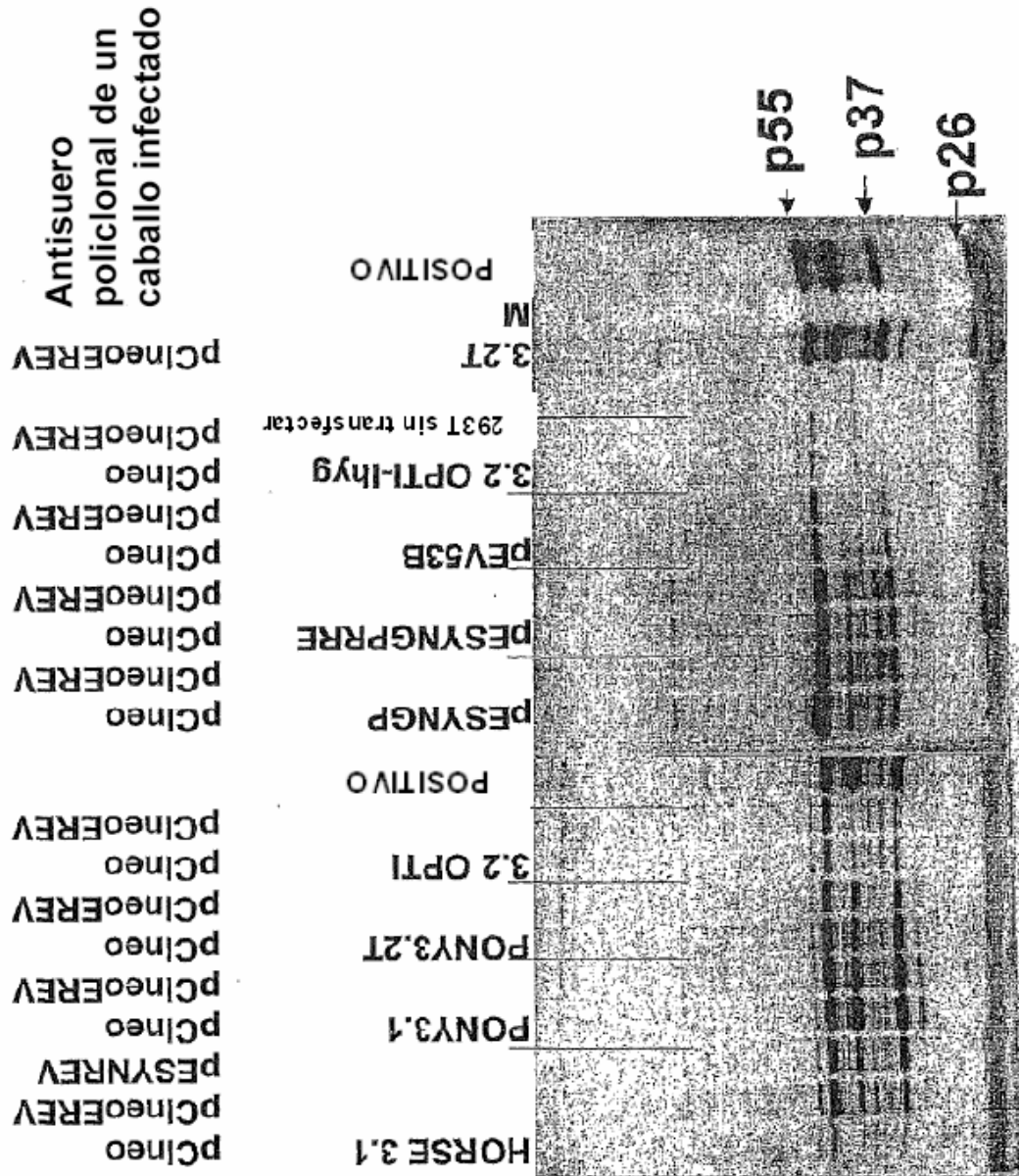


FIGURA 26 Transferencia Western de extractos de 293T



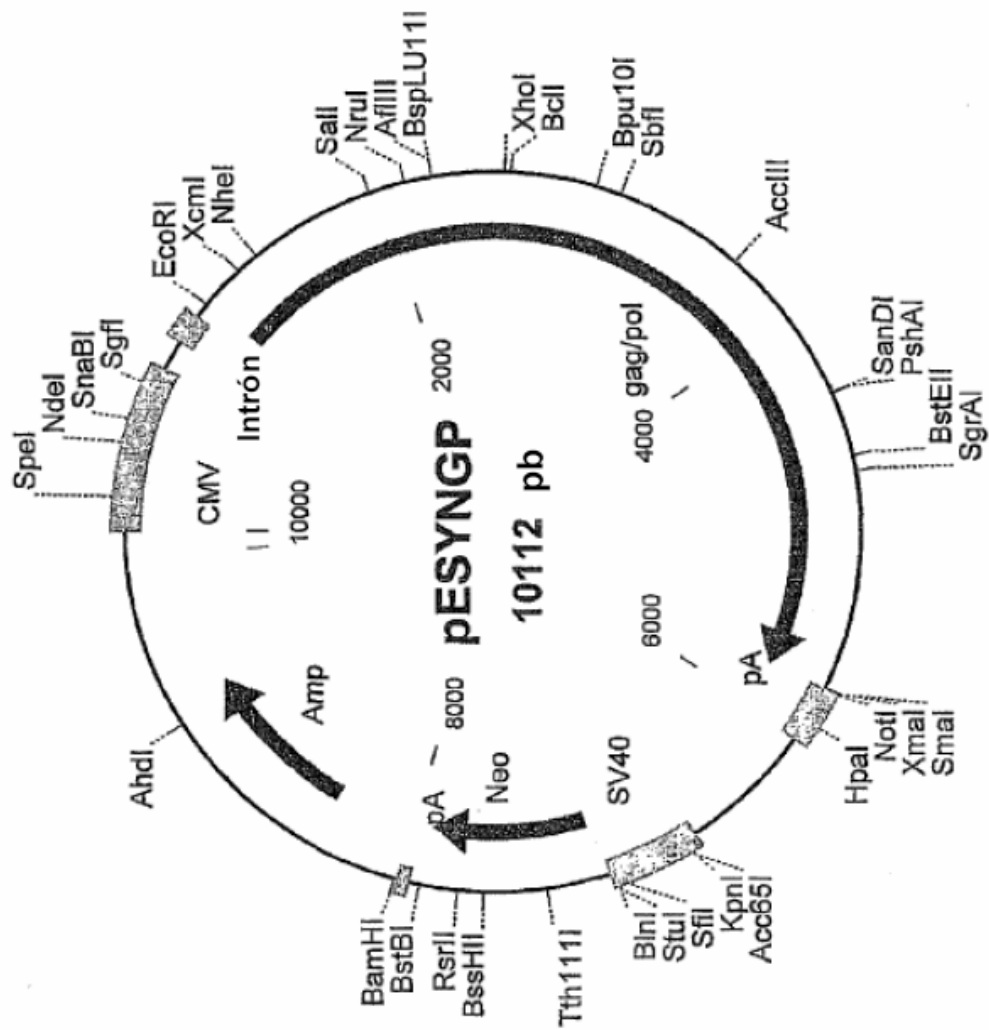


FIGURA 27

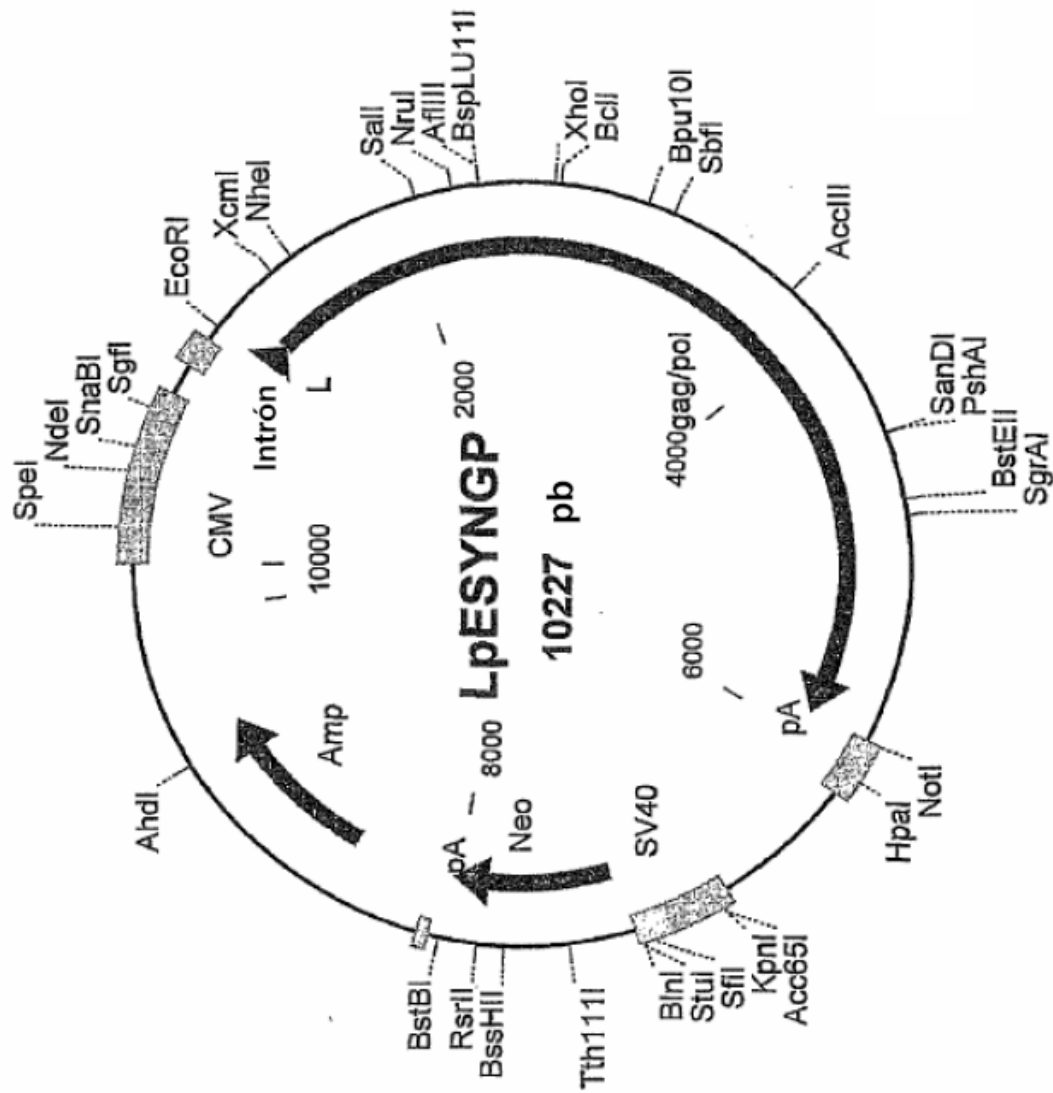


FIGURA 28

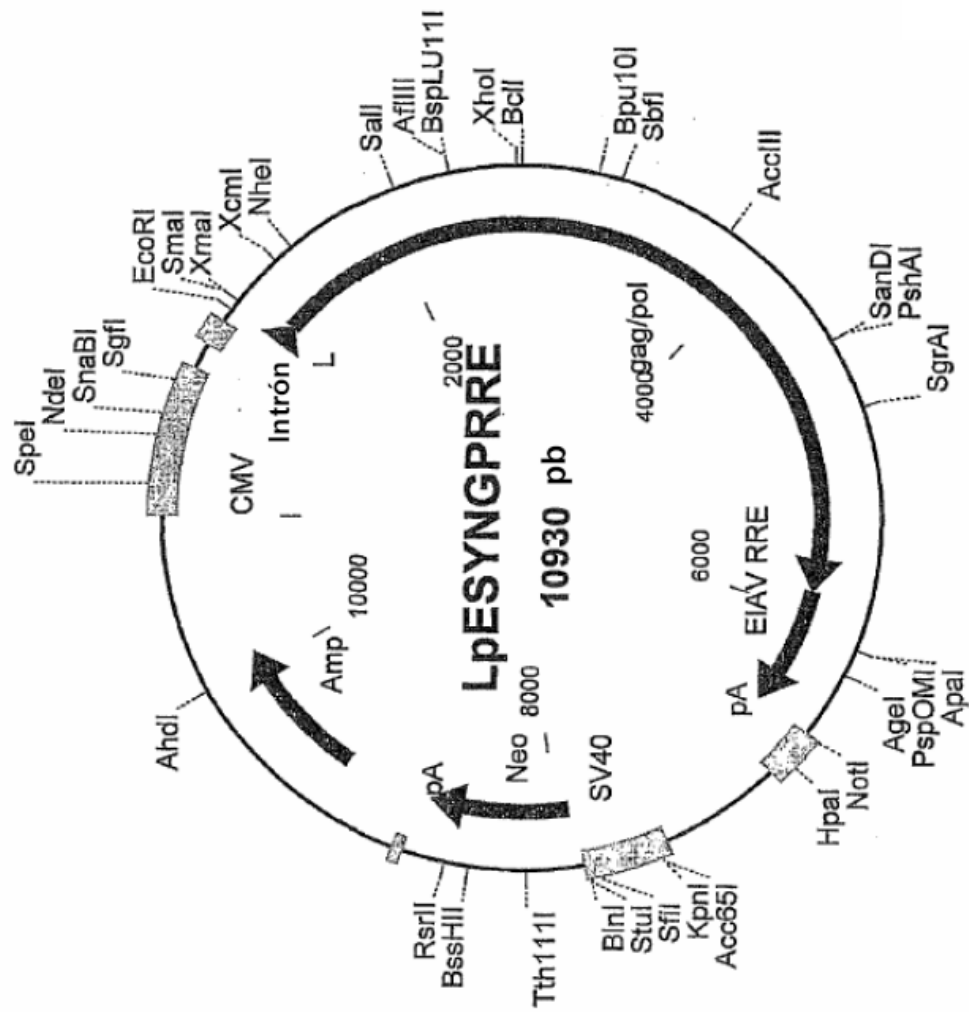


FIGURA 29

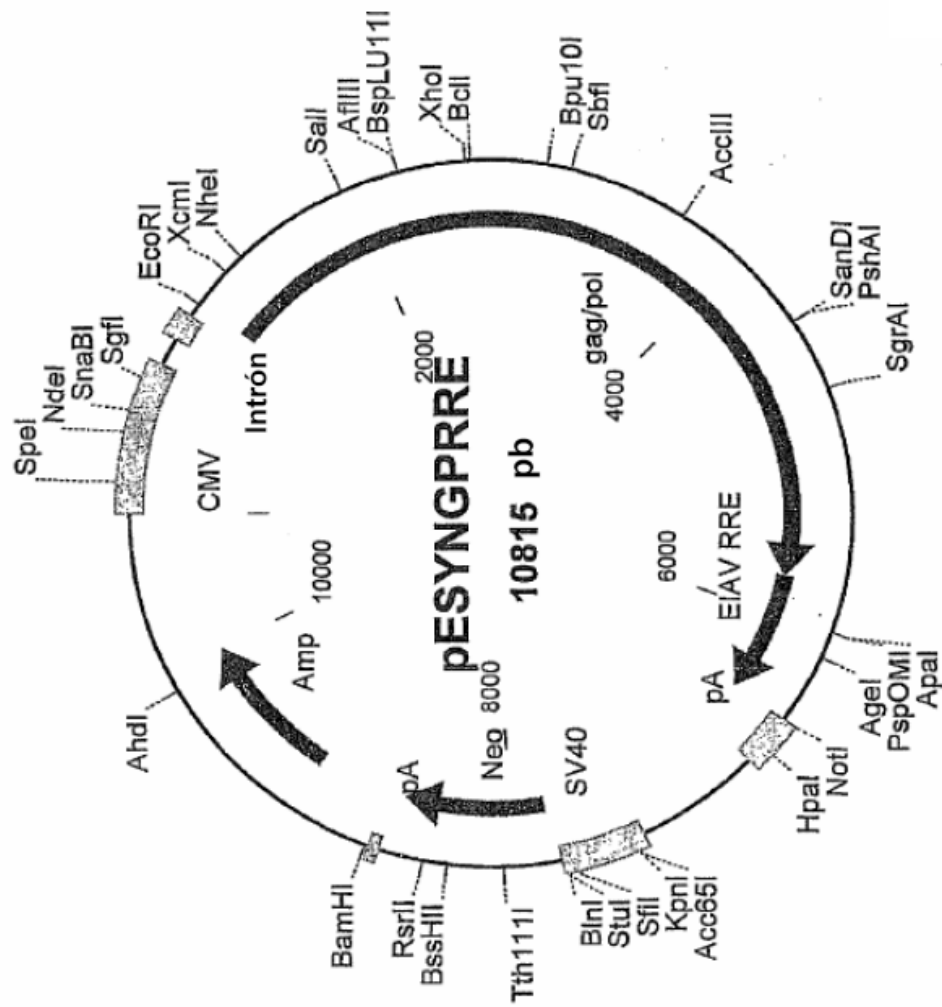


FIGURA 30

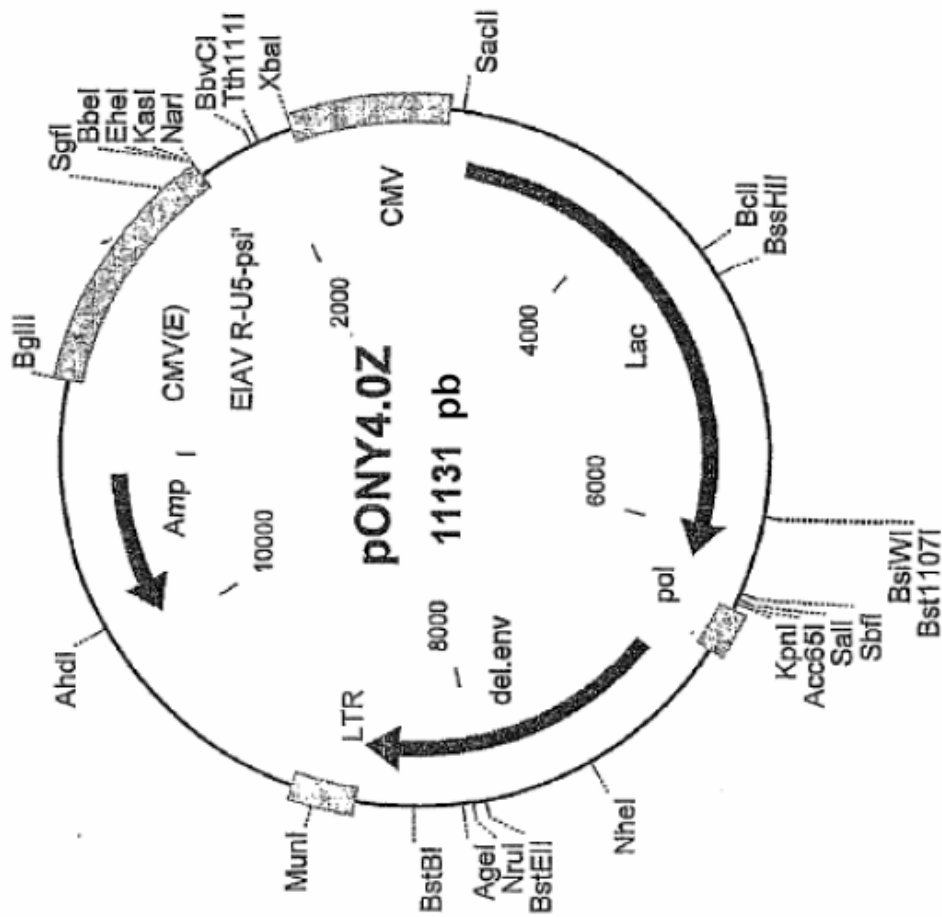


FIGURA 31

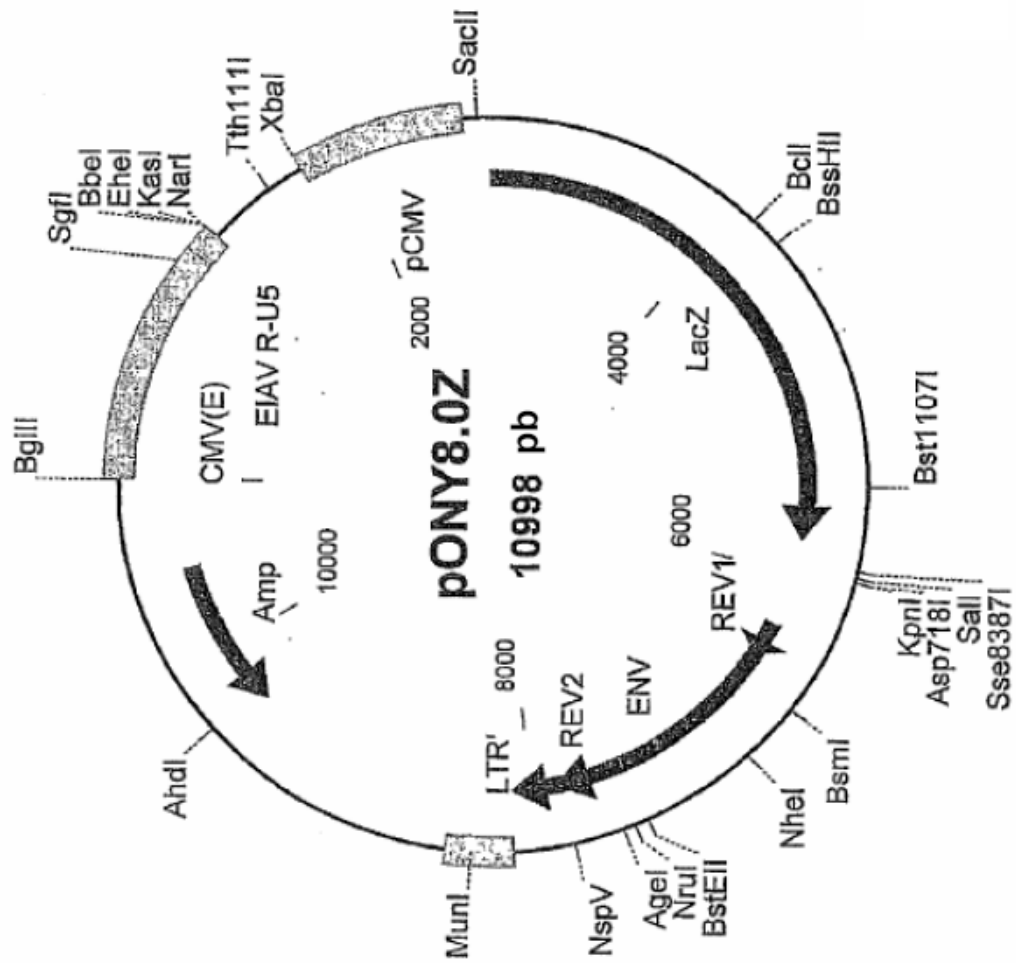


FIGURA 32

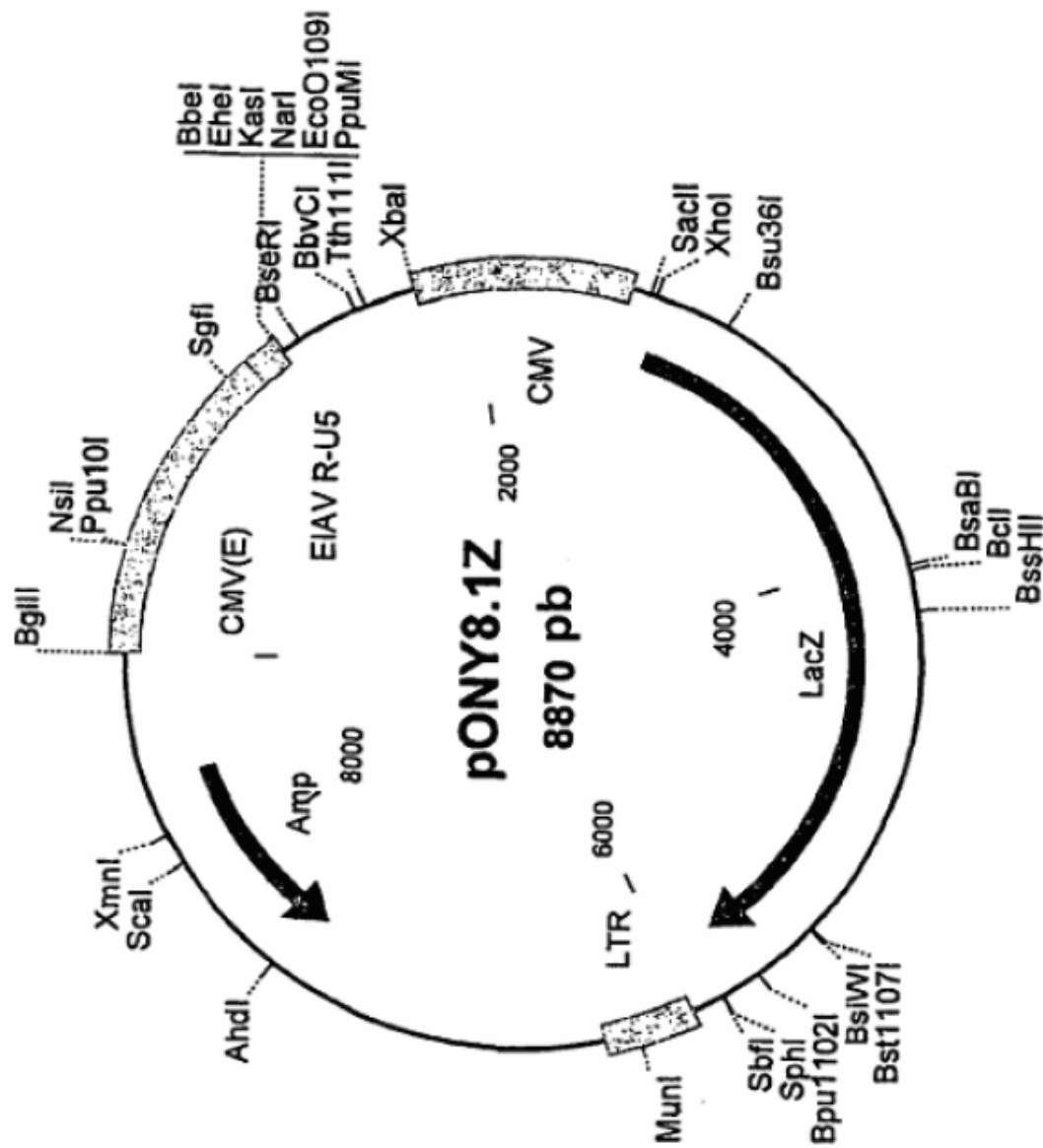


FIGURA 33

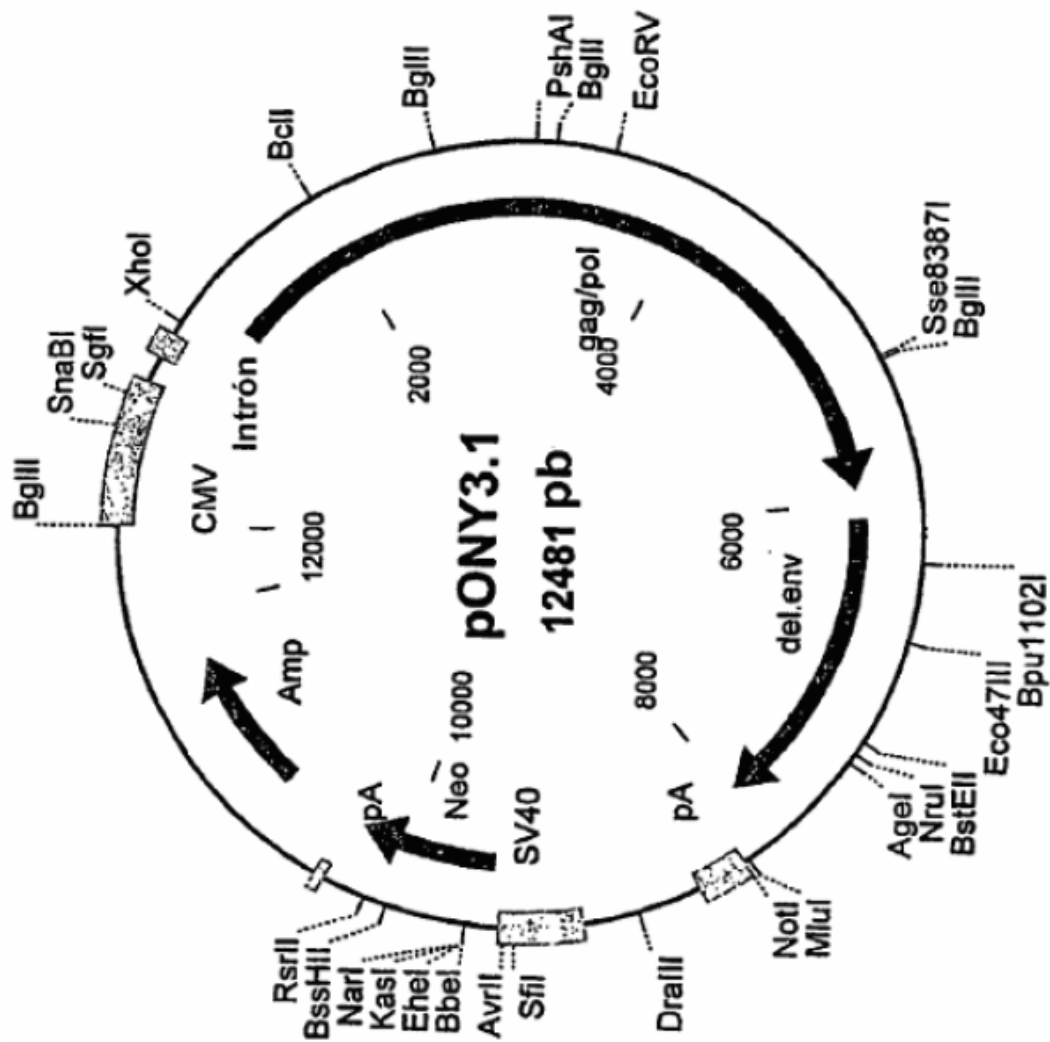


FIGURA 34

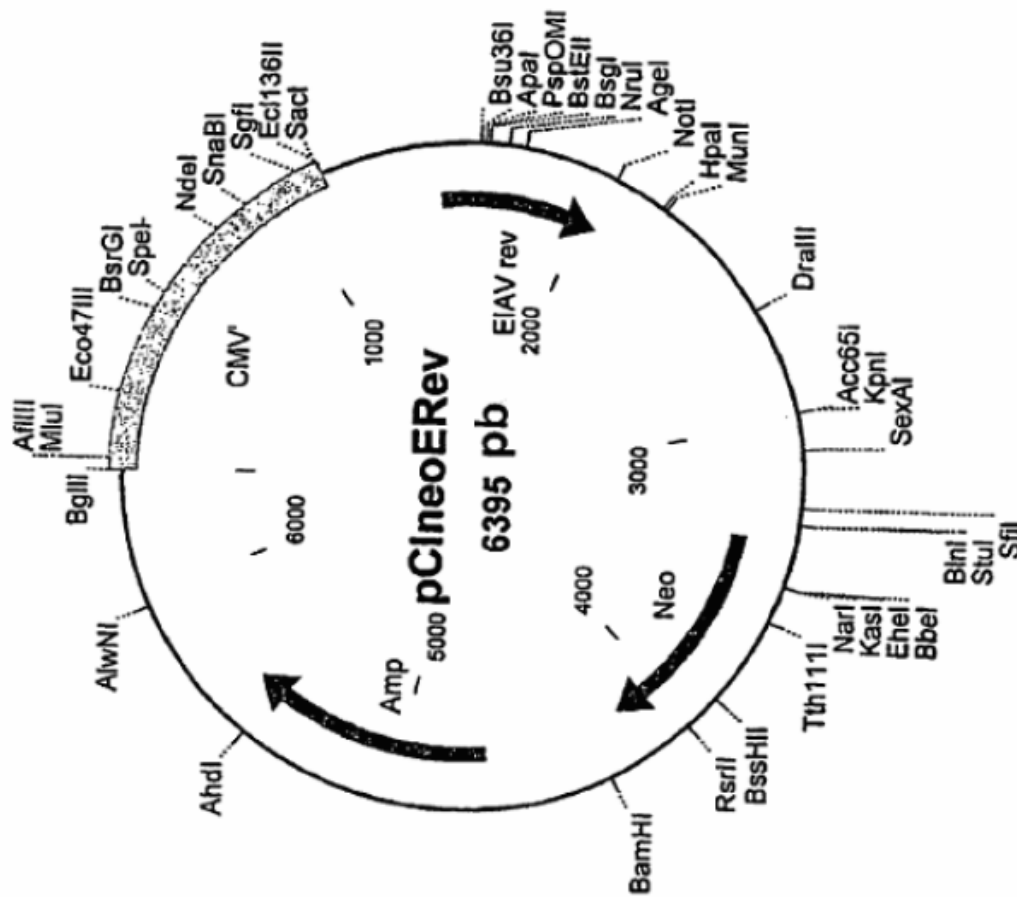


FIGURA 35

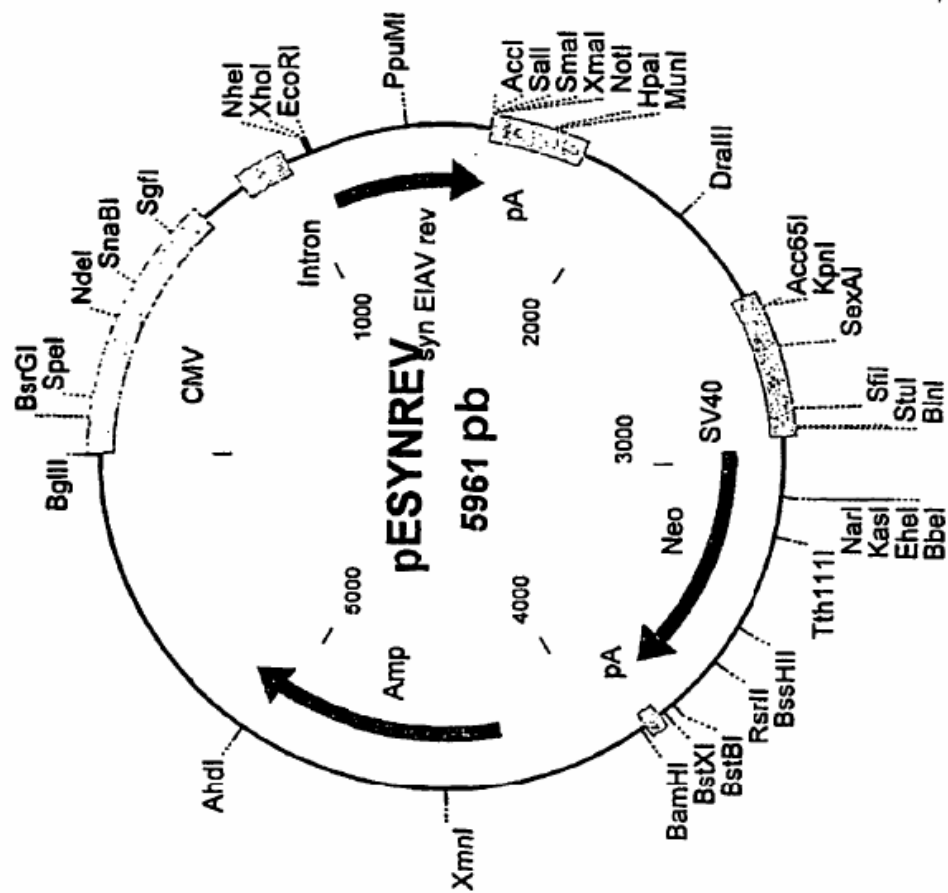


FIGURA 36

| | Genoma | Otro | TU/ml 1 | TU/ml 2 | Media |
|------------------|----------|-----------|----------|----------|----------|
| FIGURA 37 | | | | | |
| GAG-POL | | | | | |
| pONY3.1 | pONY4.0Z | ninguno | 1,84E+06 | 2,50E+06 | 2,01E+06 |
| pESYNGP | pONY4.0Z | ninguno | 9,00E+05 | 1,04E+06 | 9,67E+05 |
| pHORSE3.1 | pONY4.0Z | pCIneo | 8,80E+04 | 1,26E+05 | 1,07E+05 |
| pHORSE3.1 | pONY4.0Z | pCIneoREV | 1,48E+05 | 1,42E+05 | 1,45E+05 |
| pONY3.1 | pONY8.0Z | ninguno | 1,66E+06 | 1,48E+06 | 1,61E+06 |
| pESYNGP | pONY8.0Z | ninguno | 2,06E+05 | 1,10E+05 | 1,91E+05 |
| pESYNGP | pONY8.0Z | pCIneo | 4,00E+04 | 3,40E+04 | 2,93E+04 |
| pESYNGP | pONY8.0Z | pCIneoREV | 6,40E+04 | 8,20E+04 | 6,47E+04 |
| pHORSE3.1 | pONY8.0Z | pCIneo | 2,00E+03 | 2,00E+03 | 2,00E+03 |
| pHORSE3.1 | pONY8.0Z | pCIneoREV | 1,80E+05 | 2,48E+05 | 2,14E+05 |

FIGURA 38

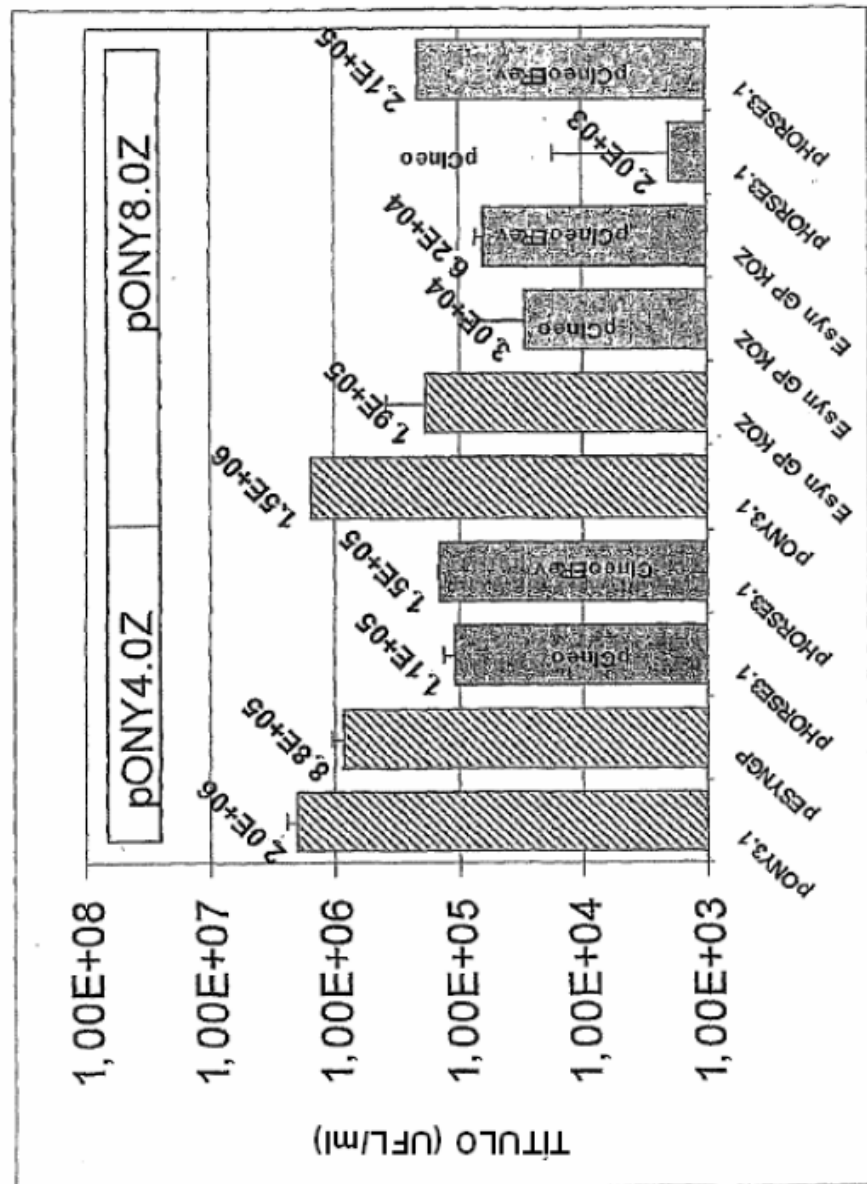


FIGURA 39

| GAG/POL | OTRO | Actividad de RT |
|-------------------------------|-------------|------------------------|
| pONY3.1 | pCIneo | 87557,9 |
| pONY3.1 | pCIneoREV | 147061,5 |
| pESYNGP | pCIneo | 45701,3 |
| pESYNGP | pCIneoREV | 63610,2 |
| L pESYNGP | pCIneo | 91729,9 |
| L pESYNGP | pCIneoREV | 88487,9 |
| L pESYNGPRRE | pCIneo | 71873,4 |
| L pESYNGPRRE | pCIneoREV | 101010,7 |
| pESYNGPRRE | pCIneo | 32823,1 |
| pESYNGPRRE | pCIneoREV | 44863,4 |
| Células 293T no transfectadas | ND | 1024,6 |
| Sin células | ND | 1330,6 |

FIGURA 40

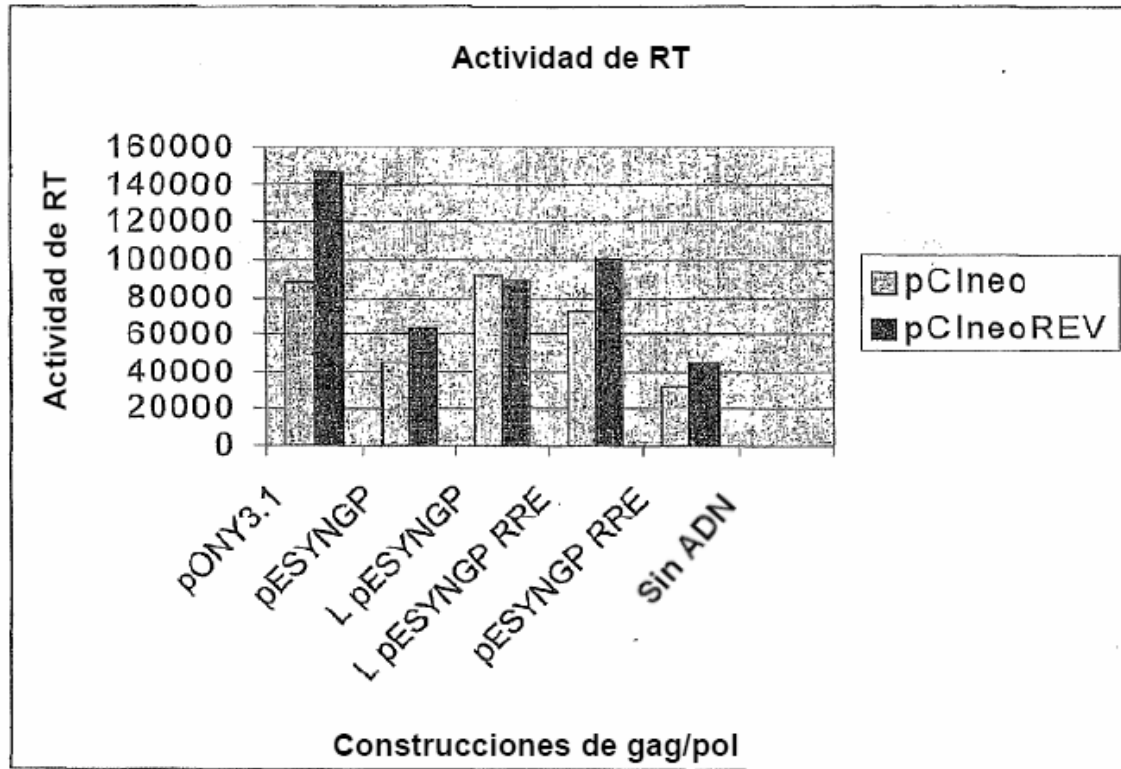


FIGURA 41

| VECTOR | GAG/POL | OTRO | Titulo/ml 1 | Título/ml 2 | media |
|----------|--------------|-----------|----------------|----------------|----------|
| pONY8.0Z | pONY3.1 | pCIneo | 3,20E+05 | 2,68E+05 | 2,94E+05 |
| pONY8.0Z | pONY3.1 | pCIneoREV | 3,00E+05 | 5,00E+05 | 4,00E+05 |
| pONY8.0Z | pESYNGP | pCIneo | 4,00E+04 | 5,60E+04 | 4,80E+04 |
| pONY8.0Z | pESYNGP | pCIneoREV | 2,22E+05 | 2,40E+05 | 2,31E+05 |
| pONY8.0Z | L pESYNGP | pCIneo | 6,00E+04 | 6,60E+04 | 6,30E+04 |
| pONY8.0Z | L pESYNGP | pCIneoREV | 2,80E+05 | 2,70E+05 | 2,75E+05 |
| pONY8.0Z | L pESYNGPRRE | pCIneo | 9,20E+04 | 6,60E+04 | 7,90E+04 |
| pONY8.0Z | L pESYNGPRRE | pCIneoREV | 3,68E+05 | 2,82E+05 | 3,25E+05 |
| pONY8.0Z | pESYNGPRRE | pCIneo | 3,20E+04 | 1,40E+04 | 2,30E+04 |
| pONY8.0Z | pESYNGPRRE | pCIneoREV | 1,20E+05 | 1,40E+05 | 1,30E+05 |

FIGURA 42

| GAG/POL | VECTOR | OTRO | título/ml 1 |
|---------|----------|------------|-------------|
| pONY3.1 | pONY8.0Z | pCIneo | 1,2E+06 |
| pONY3.1 | pONY8.0Z | pCIneoERev | 1,0E+06 |
| pONY3.1 | pONY8.1Z | pCIneo | 1,0E+05 |
| pONY3.1 | pONY8.1Z | pCIneoERev | 8,0E+05 |
| pESYNGP | pONY8.0Z | pCIneo | 2,3E+05 |
| pESYNGP | pONY8.0Z | pCIneoRev | 1,0E+05 |
| pESYNGP | pONY8.1Z | pCIneo | 1,0E+04 |
| pESYNGP | pONY8.1Z | pCIneoRev | 5,1E+04 |

FIGURA 43

Comparación de PONY3.1 (nt1246-1606) (TOP) y PONY3.2opti (nt366-726) (PARTE INFERIOR)

```

atgggagaccctttgacatggagcaaggcgctcaagaagtagagaagtgacggtacaa
....c..t..cc.c..c...tc...a..c..c..g..a..ac.g..a..a..c..c..t..g

gggtctcagaaaattaaactactggtaactgtaattgggcgctaagtctagacttattt
..tagc..a..gc.t..c..a..c..t..c..c...at.gtcc..g..g..tc.t..c

catgataccaactttgtaaaaaaggactggcagctgagggatgtcattccattgctg
..c..c..t..t..c..t..g..g..a..t...a..c..a..c..g..c..cc.ct..

gaagatgtaactcagacgctgtcaggacaagaaagagagccctttgaaagaacatggtgg
..g..c..g..c..a..at...t..g..g..gc.c..a..t..c..gc.c..c.....

gcaatttctgctgtaaagatgggcctccagattaataatgtagatggaaaggcatca
..c..cagc..a..c..a.....g..g..a..c..c..c..g..t..c..t..a..tagc

ttccagctcctaagagcgaaatatgaaaaagagactgctaataaaaaagcagtcctgagccc
..t..a..g..cc.c..t..g..c..g..a..a..c..c..c..g..a..a..c..a..t

tctgaagaatatccaatcatgatag
agc..g..g..c.....

```

FIGURA 44

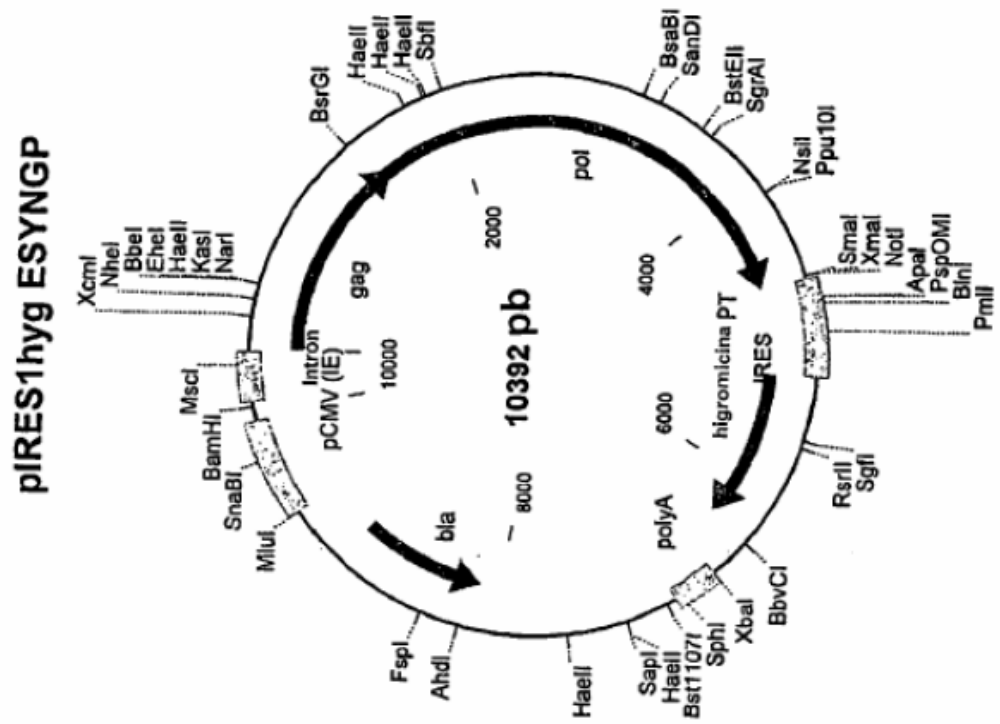


FIGURA 45

| Línea celular | Valor de Ct | Ctl _{línea celular} - Ctl _{pONY8G} transitorio |
|-------------------------------------|-------------|--|
| Q3.29 (3 x 10 ⁶ células) | 17,4 | -2,9 |
| 8Z.20(24 h tras la inducción) | 14,35 | -6,08 |
| 8Z.20(48 h tras la inducción) | 14,81 | -5,62 |
| 8Z.20(72 h tras la inducción) | 16,19 | -4,24 |
| pONY8G | 20,43 | - |

FIGURA 46

| masa de plásmido transfectado (µg)/placa de 10 cm de diámetro | | | | | | | | Título en células D17 (unidades formadoras de LacZ/ml) | | |
|--|---------|----------|----------|----------|-------|--------|-------------------|---|--|--|
| número de transfección | PESYNGP | PONY8.3G | PONY8.0Z | PESYNREV | PRV67 | pCIneo | 1ª cosecha | 2ª cosecha | | |
| 1 | 16 µg | 16 | | | 8 | | $1,4 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ | | |
| 2 | | 16 | | | 8 | 16 | $1,4 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ | | |
| 3 | | 16 | | | 8 | | $1,4 \times 10^5$ | $2,6 \times 10^5$ | | |
| 4 | | 32 | | | 8 | | $2,8 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^6$ | | |
| 5 | | | 16 | 8 | 8 | | $2,4 \times 10^5$ | $2,8 \times 10^5$ | | |
| 6 | | | 32 | 8 | 8 | | $4,5 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^6$ | | |

FIGURA 47

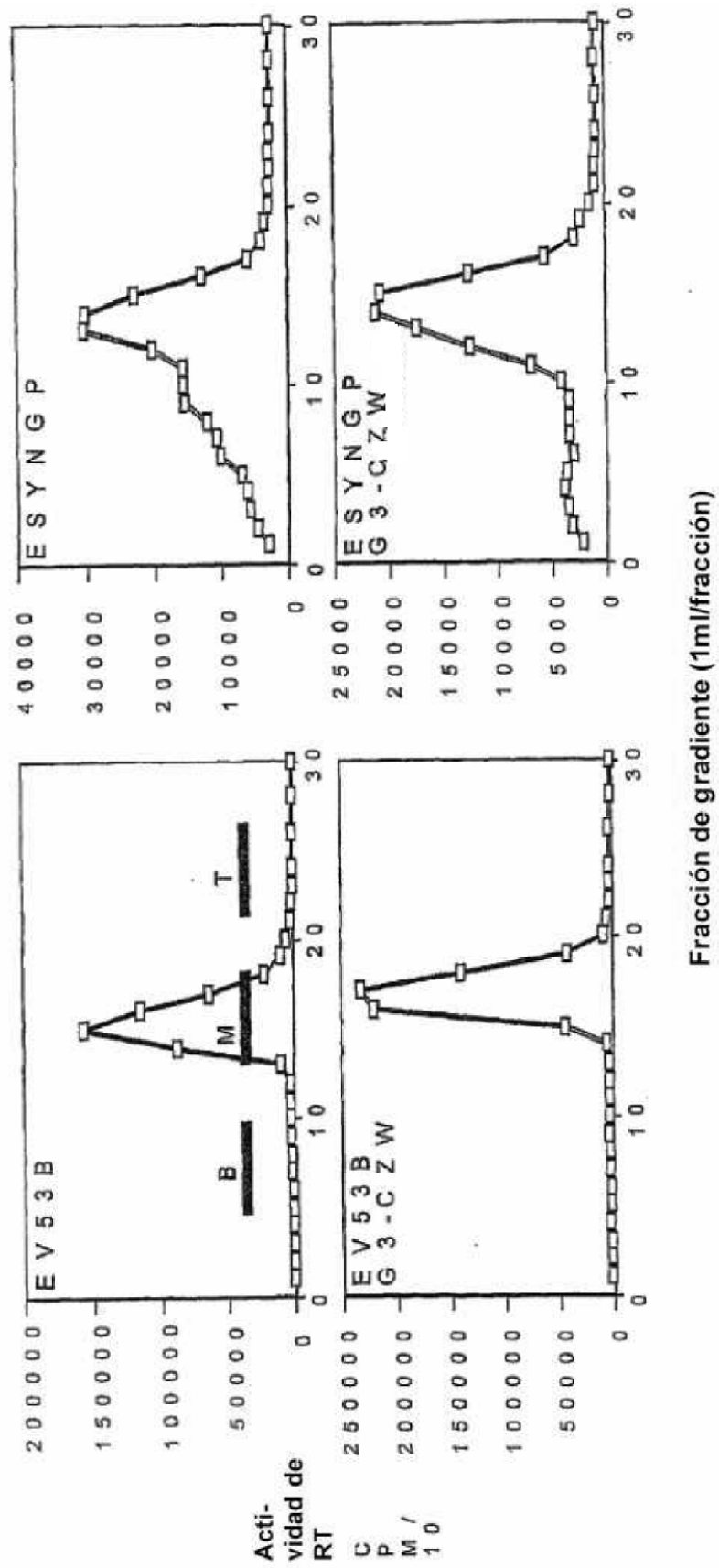


FIGURA 48

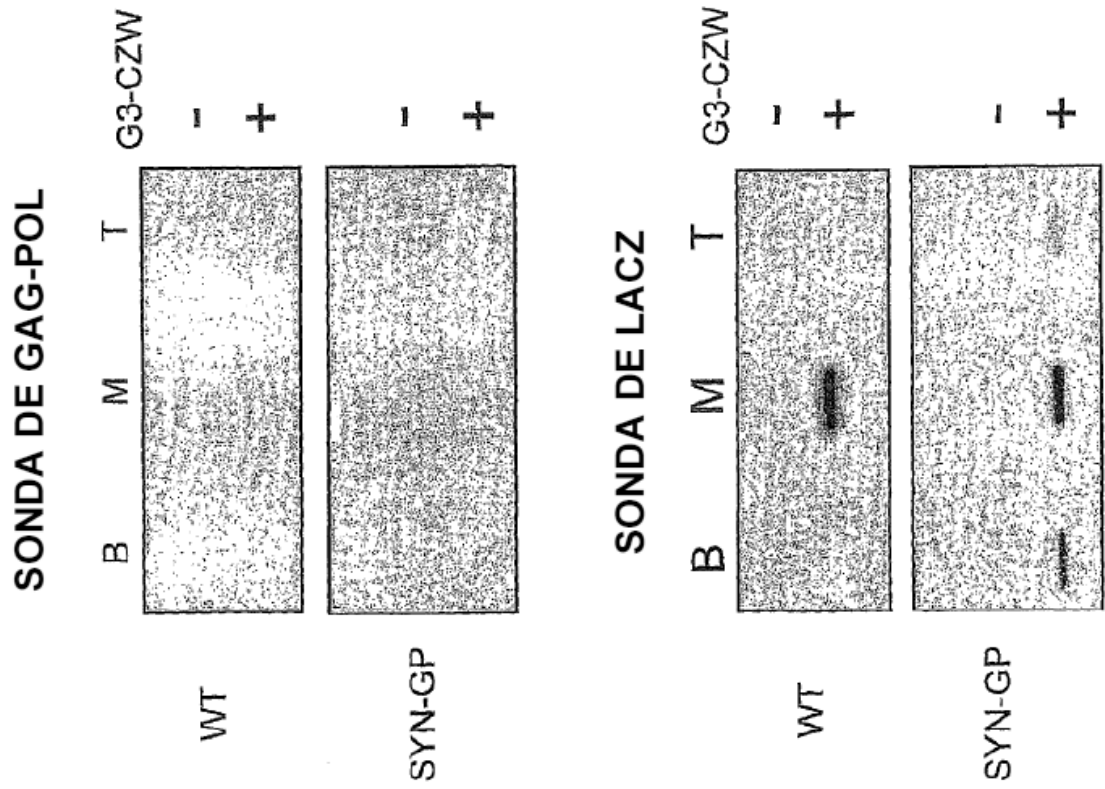


FIGURA 49

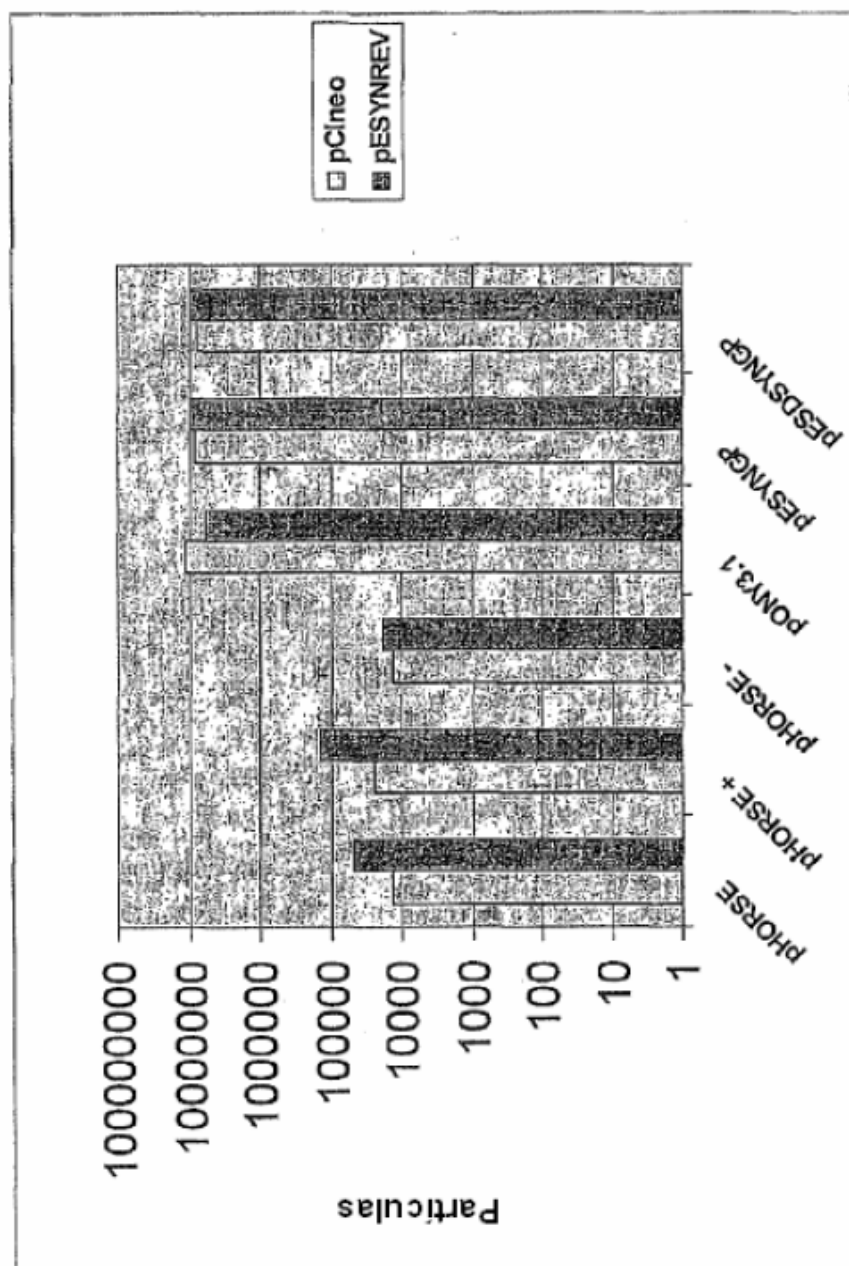


FIGURA 50

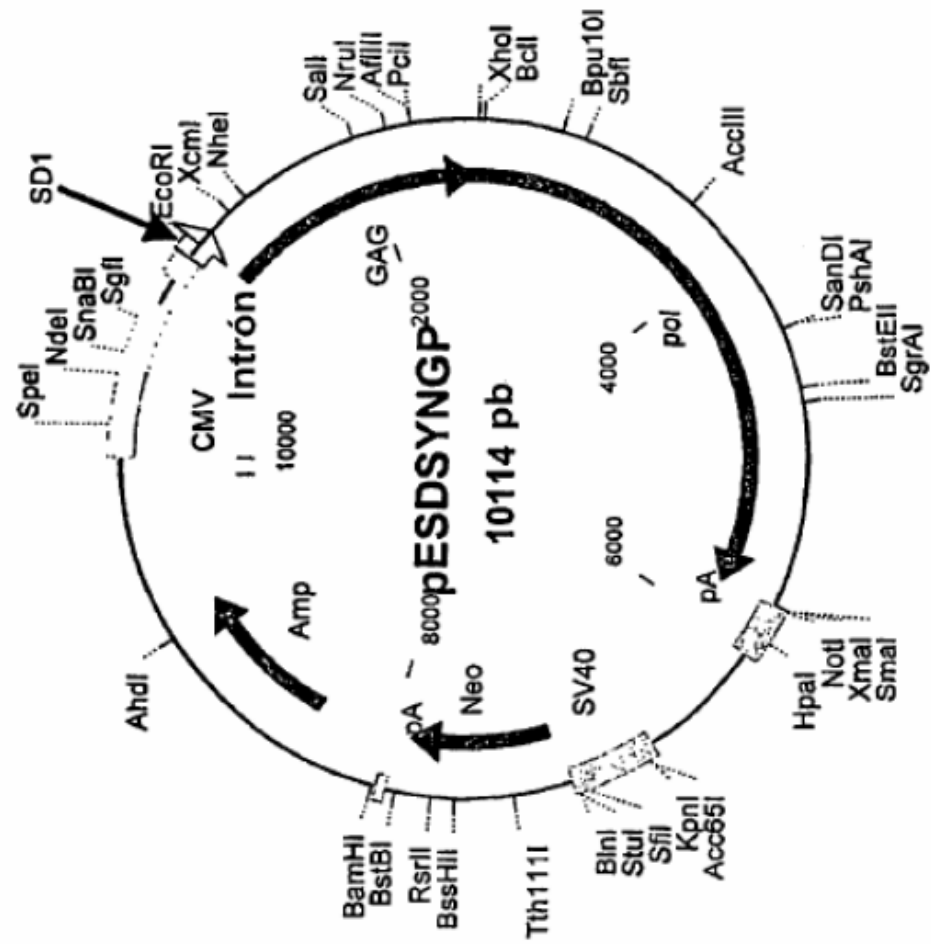


FIGURA 51

